

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

ENDOCRINOLOGIA DEGLI ANIMALI DOMESTICI

Ciclo XX

VET 02 FISIOLOGIA VETERINARIA

IL 2-METOSSIESTRADIOLO: UN POTENZIALE INIBITORE
FISIOLOGICO DELL'ANGIOGENESI FOLLICOLARE

Tesi di Dottorato della **Dr.ssa SUJEN ELEONORA SANTINI**

Coordinatore Dottorato
Chiar.mo Prof. Eraldo Seren

Relatore
Chiar.ma Prof.ssa Francesca Grasselli

Esame finale anno 2008

ABSTRACT

The formation of new blood vessels plays an obligatory role in the successful growth and development of ovulatory follicles. Therefore, a more complete understanding of the regulatory influences that promote or inhibit follicular angiogenesis is important. While in the past years the pro-angiogenetic events have been extensively studied, less information exists on the regulation of antiangiogenesis in the ovary. Evidence is growing that 2-methoxyestradiol (2-ME), an estradiol metabolite, is a potent inhibitor of tumor growth and that its ability to suppress tumorigenesis is due to its antiangiogenetic effect. Follicular fluid, which fills the antrum of the ovarian follicle, is a potential reservoir of 2-ME as a product of granulosa cell catechol-*O*-methyltransferase activity thus possibly qualifying this substance as an ovarian angiogenesis inhibitor. Therefore, this study was aimed primarily to quantify 2-ME concentrations in swine follicular fluid collected from different size follicles by validation of a SPE-GC-MS method. In order to investigate the possible role of 2-ME in the regulation of ovarian angiogenesis we tested the effect of 2-ME on the production of the main pro-angiogenetic factor VEGF by swine granulosa cell. Additionally, since several studies point out a role for ROS as signal transducers in the angiogenic response, we evaluated the effect of 2-ME on both the generation of superoxide anion (O_2^-) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in swine granulosa cell. The potential antiangiogenetic activity of 2-ME was also studied in porcine Aortic Endothelial Cells (AOC) included in a three-dimensional fibrin gel; endothelial cell proliferation was measured by means of Scion Image Beta. Our results demonstrate that swine follicular fluid effectively contains 2-ME; we also evidenced that its concentrations increase during follicle growth, becoming almost four fold higher in medium and ten fold higher in large follicles as respect to the small ones. 2-ME inhibited VEGF production and O_2^- generation in swine granulosa cells, while it stimulated SOD activity. Since we previously demonstrated that a stimulation of O_2^- generation triggers the angiogenetic response in granulosa cells, we can hypothesize that 2-ME potentially acts on VEGF production by an alteration of the redox status in granulosa cells. Moreover, a significant decrease of AOC proliferation was induced by 2-ME, suggesting a possible direct role of 2-ME in endothelial cell proliferation. Taken together, our data suggest that 2-ME can represent a physiological candidate of antiangiogenesis modulation in the ovarian follicle.

INDICE

1 IL FOLLICOLO OVARICO: UN MODELLO DI ANGIOGENESI FISIOLOGICA	pag. 1
1.1 L'ovaio: cenni anatomici e basi fisiologiche	pag. 1
1.2 Follicologenesi	pag. 5
1.2.1 <u>Fase preantrale</u>	
1.2.2 <u>Fase antrale</u>	
1.2.3 <u>Follicolo preovulatorio</u>	
1.2.4 <u>Ovulazione</u>	
1.2.5 <u>Il corpo luteo</u>	
1.3 Steroidogenesi	pag. 20
1.3.1 <u>Estrogeni</u>	
1.3.2 <u>Progesterone</u>	
1.3.3 <u>Androgeni</u>	
1.4 Il fluido follicolare	pag. 28
1.5 Angiogenesi ovarica: rimodellamento dell'architettura vascolare	pag. 33
1.5.1 <u>Il processo angiogenetico</u>	

- 1.5.2 VEGF e angiogenesi ovarica
- 1.5.3 Altri potenziali fattori angiogenetici ovarici
- 1.5.4 Potenziali fattori anti-angiogenetici ovarici
- 1.5.5 Estrogeni, progesterone e angiogenesi ovarica

2 IL 2-METOSSIESTRADIOLO pag. 71

2.1 Biosintesi e metabolizzazione pag. 71

2.2 Effetti biologici pag. 73

3 SCOPI pag. 80

4 MODELLO SPERIMENTALE pag. 82

4.1 Raccolta delle ovaie pag. 82

4.2 Raccolta del fluido follicolare pag. 83

4.3 Quantificazione dell'estradiolo-17 β e dei catecolestrogeni nel fluido follicolare pag. 84

4.4 Estrazione e coltura delle cellule della granulosa pag. 86

4.5 Saggi sui media di coltura delle cellule della granulosa pag. 88

4.5.1 Produzione del VEGF

4.5.2 Dosaggio dell'anione superossido (O_2^-)

4.5.3 Attività della superossidodismutasi (SOD)

4.6 Saggio angiogenetico in gel di fibrina pag. 91

4.6.1	<u>Quantificazione dello sviluppo endoteliale</u>	
4.7	Analisi statistica	pag. 94
5	RISULTATI	pag. 95
5.1	Quantificazione dell'estradiolo-7 β e dei catecolestrogeni nel fluido follicolare	pag. 95
5.2	Saggi sui media di coltura delle cellule della granulosa	pag. 97
5.2.1	<u>Produzione del VEGF</u>	
5.2.2	<u>Dosaggio dell'anione superossido (O_2^-)</u>	
5.2.3	<u>Attività della superossidodismutasi (SOD)</u>	
5.3	Saggio angiogenetico in gel di fibrina	pag. 100
5.3.1	<u>Quantificazione dello sviluppo endoteliale</u>	
6	DISCUSSIONE	pag. 102
7	CONCLUSIONI	pag. 111
8	BIBLIOGRAFIA	pag. 111

IL FOLLICOLO OVARICO: UN MODELLO DI ANGIOGENESI FISIOLÓGICA

1.1 L'ovaio: cenni anatomici e basi fisiologiche

Le ovaie rappresentano le gonadi femminili, strutture pari e simmetriche collocate nella regione lombare che possiedono una superficie esterna irregolare in funzione dalle strutture presenti e della specie considerata (*figura 1*).



Figura 1. Ovaio: differenze di specie. a) cavalla; b) vacca; c) scrofa.

Nella maggior parte degli animali l'ovaio si compone di due zone distinte: una corticale o zona parenchimatosa, situata al di sotto dell'epitelio superficiale, e una midollare o zona vascolosa più interna, ricca di ramificazioni flessuose delle arterie e delle vene ovariche che le conferiscono un aspetto spongioso (*figura 2*).

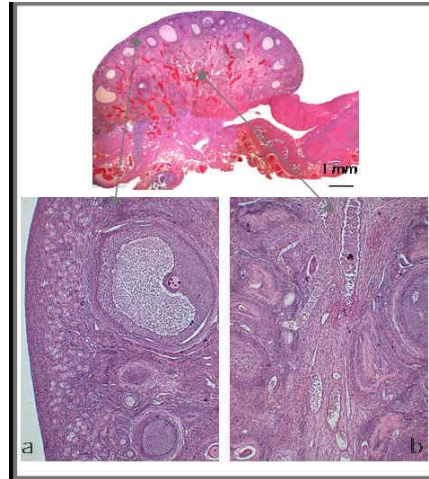


Figura 2. Ovaio: immagine istologica. a) corticale; b) midollare.

Da questa rete derivano le arteriole precapillari dalle quali origina il letto vascolare che alimenta il parenchima. Ciascun componente del parenchima, rappresentato nella femmina fertile dai follicoli funzionali contenenti i gameti (ovociti) e dal complesso di formazioni che derivano dalla loro evoluzione e/o involuzione, varia nelle sue caratteristiche morfologiche e funzionali in relazione alle fasi del ciclo ovarico; ad ognuna di queste fasi specifiche si associa un radicale cambiamento del letto vascolare (Fraser et al., 2001) (*figura 3*). I vasi rendono inoltre possibile una comunicazione endocrina tra l'ovaio, l'ipotalamo-ipofisi e l'utero, indispensabile per la coordinazione dell'ovulazione, fertilizzazione e impianto.

L'importanza funzionale dell'ovaio si esprime infatti attraverso due attività: esocrina, ovvero gametogena, che assicura l'oogenesi tramite la produzione di gameti femminili, ed endocrina, che si esplica mediante la secrezione degli ormoni steroidei estrogeni e progesterone e degli ormoni follicolari peptidici quali l'inibina, l'activina e la follistatina.

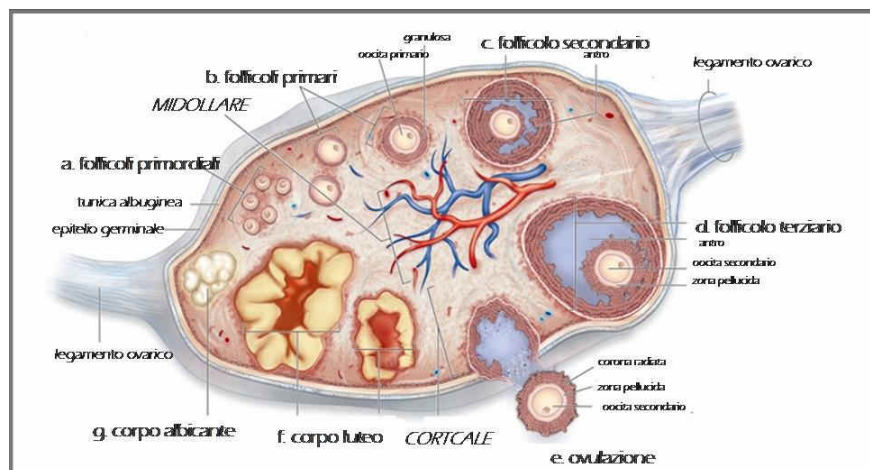


Figura 3. Struttura ovarica in sezione.

L'integrazione delle attività gametogenica e steroidogenica esita nei processi di maturazione follicolare, ovulazione, formazione del corpo luteo e sua regressione, che, nel loro insieme, rappresentano la dinamica funzionale del ciclo ovarico della femmina fertile (figura 4).

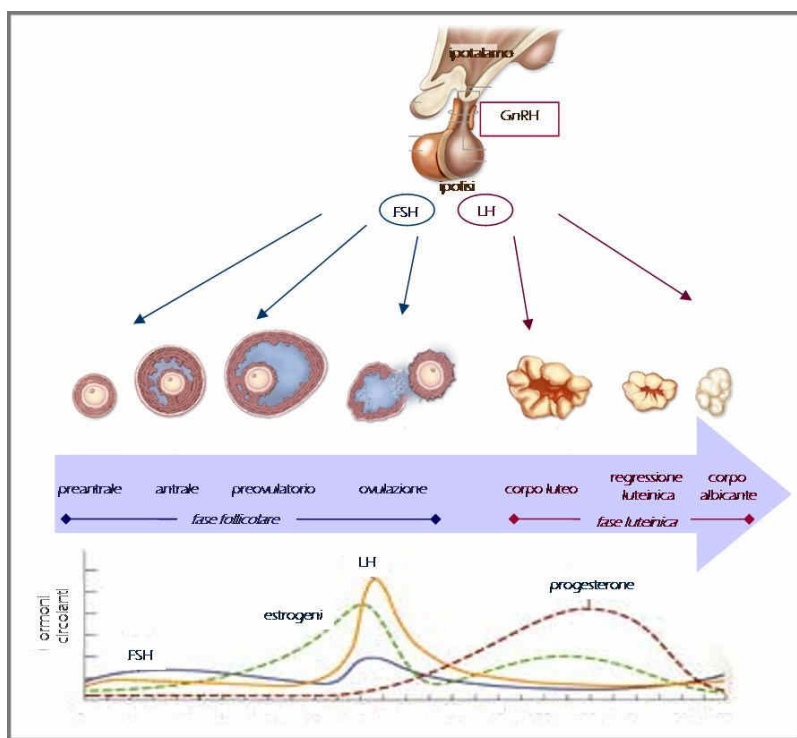


Figura 4. Controllo ormonale della fase follicolare e della fase luteale.

Le due funzioni sono sotto lo stretto controllo delle gonadotropine ipofisarie FSH e LH: in particolare, l'FSH determina l'accrescimento e la maturazione dei follicoli ovarici stimolandoli a secernere estrogeni, l'LH provoca l'ovulazione e il successivo sviluppo del corpo luteo. Il rilascio delle gonadotropine è a sua volta regolato da sistemi di controllo nervoso ed endocrino, rappresentanti dal fattore di rilascio delle gonadotropine (GnRH) ipotalamico e dagli stessi ormoni ovarici, portando quindi alla definizione di asse ipotalamo-ipofisi-ovaio.

Estrogeni e progesterone agiscono a livello dell'ipotalamo e dell'ipofisi, con meccanismi a feedback positivi e negativi, modificando il rilascio di GnRH, FSH e LH, e autoregolando in tal modo la loro stessa secrezione.

Activina e inibina, prodotte dal follicolo, rispettivamente attivano e inibiscono il rilascio di FSH da parte dell'ipofisi. In particolare, l'activina stimola l'espressione dei recettori follicolari per l'FSH, promuove la sintesi di estrogeni stimolata dall'FSH, mentre inibirebbe la secrezione progestinica (Hillier e Mirò, 1993). L'FSH stimola la sintesi di follistatina a livello follicolare, proteina che lega l'activina sopprimendone la bioattività, e di inibina che riduce la produzione di activina dalle cellule della granulosa. L'incremento dei livelli periferici di inibina determina inoltre la riduzione della concentrazione sierica di FSH che può indurre l'atresia di altri follicoli meno maturi.

L'ovaio deve essere quindi inteso come un tessuto eterogeneo, la cui attività, di momento in momento, è l'espressione delle diverse subunità morfofunzionali che lo costituiscono nel breve periodo della loro dominanza che, in condizioni fisiologiche, si ripete ciclicamente durante tutto il periodo riproduttivo.

1.2 Folliculogenesi

La folliculogenesi rappresenta un meccanismo fisiologico dagli aspetti molteplici, con ritmi e frequenze decisamente più intensi della cadenza dei cicli estrali.

Alla nascita, una femmina possiede già un capitale follicolare completo, il quale diminuisce durante la vita riproduttiva con l'avvio della folliculogenesi che può esitare in due fenomeni: l'ovulazione e l'atresia. Alcuni follicoli possono anche rimanere allo stadio primordiale e non mostrare segni di crescita o di atresia.

Lo sviluppo follicolare procede infatti attraverso stadi di reclutamento, selezione e dominanza.

Il reclutamento è un processo attraverso il quale una coorte di follicoli primordiali, adeguatamente stimolati, inizia a maturare.

Attraverso la selezione, uno o più follicoli "reclutati" vengono scelti, gradualmente diventano più grandi degli altri e, guidati da un sufficiente contenuto di gonadotropine nell'ambiente che li circonda, acquisiscono il potenziale ovulatorio.

La dominanza è il meccanismo mediante il quale il o i follicoli selezionati spingono i follicoli subordinati a regredire ed inibiscono il reclutamento di una nuova coorte follicolare.

Le dinamiche della folliculogenesi sono specie-specifiche: nelle specie politoche, come ad esempio il suino, i follicoli dominanti si sviluppano durante tutta la fase follicolare, portando alla maturazione di 10-25 follicoli per ciclo; mentre nelle specie monotocche il loro reclutamento, selezione e dominanza avvengono ad intervalli regolari portando all'ovulazione un solo follicolo.

Soltanto lo 0.1% dei follicoli che iniziano l'ovogenesi porta a termine con successo il suo sviluppo e giunge quindi ad ovulazione: tutti i follicoli che non superano le fasi di reclutamento e selezione non procedono nel loro sviluppo e sono destinati ad un processo involutivo definito atresia (*figura 5*), strettamente controllato dal bilancio tra i livelli di gonadotropine e i loro recettori specifici (Manabe et al., 2004).

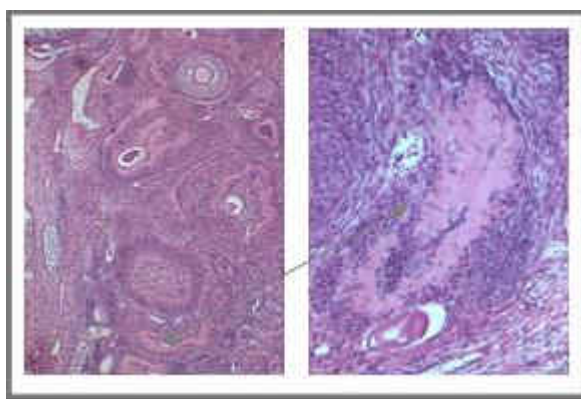


Figura 5. Immagine istologica: follicoli atresici.

Tale processo di atresia ha significati funzionali ben precisi, poiché determina l'eliminazione della maggior parte delle cellule germinali, regolando così la capacità riproduttiva delle varie specie (Feng et al., 2007).

Prima di diventare atresici, i follicoli partecipano alla steroidogenesi ovarica, favorendo quindi anche la maturazione iniziale del follicolo che poi ovulerà; le cellule tecali, formando il tessuto interstiziale, aumentano il substrato disponibile per la sintesi steroidea.

L'atresia può quindi coinvolgere il follicolo durante tutte le fasi della sua crescita. Nello specifico comporta morte dell'oocita, irregolarità nello strato della granulosa e picnosi delle cellule. Nei follicoli antrali è macroscopicamente identificabile con la

perdita di trasparenza del liquido follicolare e regressione della vascolarizzazione tecale con conseguente collasso follicolare che assume l'aspetto fibroso di una cicatrice: il corpo atresico.

1.2.1 Fase preantrale

Nella corticale dell'ovaio sono presenti già alla nascita i follicoli primordiali, costituiti da un singolo oocita circondato da epitelio pavimentoso semplice (*figura 6*). Queste strutture rappresentano una riserva di materiale germinale, drasticamente ridotta dalla selezione stringente che si realizza dopo la pubertà e che esita nella produzione di un limitato numero di gameti femminili maturi.

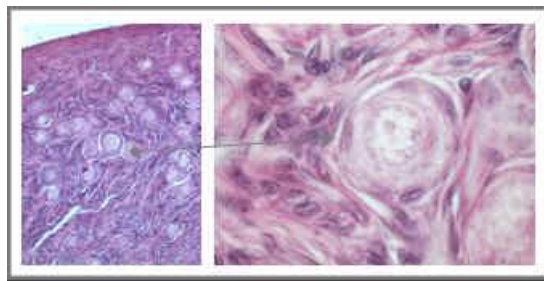


Figura 6. Immagini istologiche: follicoli primordiali.

L'avvio dell'accrescimento follicolare è probabilmente stimolato dalla gemmazione microvascolare locale e si realizza sotto controllo paracrina a cui paiono concorrere diversi fattori (Senbon et al., 2003) che inducono la sintesi e l'accumulo di riserve metaboliche e molecole regolatrici utilizzate nelle fasi successive dello sviluppo.

Il passaggio da follicolo primordiale a follicolo primario è contraddistinto dalla differenziazione morfofunzionale delle sue cellule che assumono forma cubica e proliferano attivamente, disponendosi su strati sovrapposti: si forma quindi una membrana nota come parete della granulosa (*figura 7*).

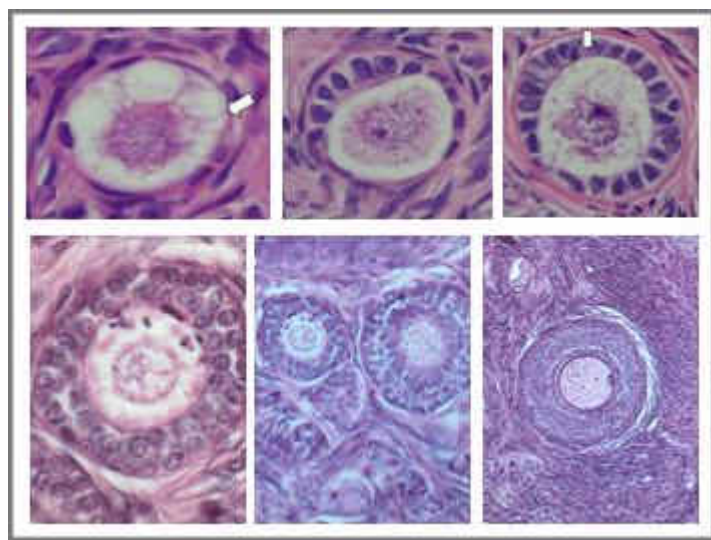


Figura 7. Immagini istologiche: sviluppo e progressiva stratificazione della parete della granulosa.

Le cellule della granulosa e l'oocita secernono grandi quantità di glicoproteine che costituiranno la zona pellucida, una barriera acellulare che isola entrambi dal supporto vascolare (Gook et al., 2008). La cooperazione metabolica tra le due strutture viene garantita dalla formazione di prolungamenti citoplasmatici che attraversano la zona pellucida in entrambi i sensi consentendo lo scambio di aminoacidi, glucosio, metaboliti, nucleotidi e fattori di crescita (Eppig, 1991) sia fra le cellule stesse sia con l'oocita (*figura 8*).

Essendo la granulosa avascolare, la presenza di canali di membrana intercellulari diviene essenziale; la loro mancanza esita infatti in un arresto della maturazione follicolare: le cellule della granulosa cessano di proliferare, l'oocita interrompe la sua crescita e non è in grado di acquisire una completa competenza meiotica (Kidder e Mhawji, 2002).

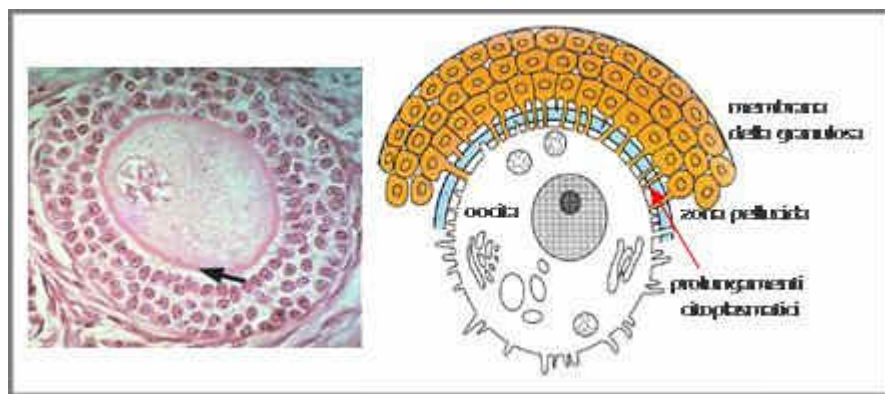


Figura 8. Prolungamenti citoplasmatici: comunicazione granulosa-oocita attraverso la zona pellucida.

Il passaggio alla successiva fase antrale presuppone la formazione di un altro elemento parietale: la membrana tecale. Le cellule dello stroma ovarico si condensano infatti sulla membrana propria che consiste in collagene tipo IV, fibronectina e laminina e formano una nuova matrice cellulare; questa risulta costituita da voluminosi elementi fusiformi o poliedrici con caratteristiche ultrastrutturali tipiche delle cellule steroidogenetiche, accolti in una trama connettivale ricca di capillari che assicurano il rifornimento di gonadotropine, fattori di crescita, ossigeno e precursori steroidei al follicolo in crescita.

Questo elemento parietale si differenzia in due strati: la teca interna, ghiandolare e ricca di vasi disposti a formare un singolo anello capillare accerchiante il follicolo, e la teca esterna, una capsula fibrosa e muscolare scarsamente vascolarizzata (Tajima et al., 2007) (*figura 9*).

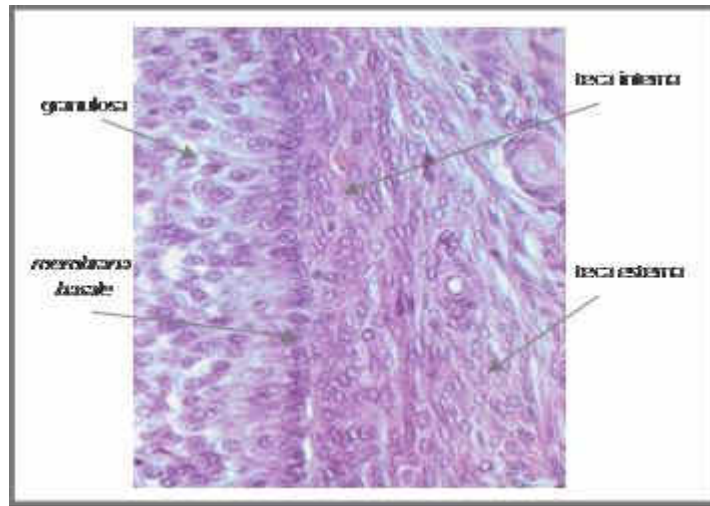


Figura 9. Elementi della parete follicolare.

Si assiste inoltre al progressivo spostamento del follicolo dalla zona corticale verso gli strati più profondi e più ricchi di vasi, che gli consente di essere raggiunto con maggior facilità dalle sostanze nutritive, dai gas respiratori e dalle gonadotropine.

Verso la fine della fase preantrale, si assiste infatti alla comparsa, in entrambi gli strati parietali, dei recettori per le gonadotropine (Barbieri et al., 1997): mentre tutte le fasi precedenti sono indipendenti dalle gonadotropine, da questo momento in poi questi ormoni sono indispensabili per l'acquisizione delle proprietà steroidogeniche e per la follicologenesi.

In particolare, sulle cellule della granulosa compaiono i recettori per l'FSH, mentre i recettori per l'LH sono inizialmente espressi solo dalle cellule tecali dove stimolano la conversione di colesterolo in androgeni.

Livelli ematici adeguati di FSH ed LH, associati all'acquisizione di un numero sufficiente di recettori da parte del follicolo, rappresentano quindi le condizioni indispensabili per salvare i follicoli in questa fase dal destino atresico avviandoli alla formazione dell'antro.

1.2.2 Fase antrale

In questa fase il follicolo aumenta progressivamente le sue dimensioni, le cellule della granulosa proliferano ulteriormente e acquistano nuove competenze funzionali. Quando la membrana della granulosa raggiunge 6-12 strati, si sviluppano al suo interno estese lacune contenenti un fluido viscoso, che andranno progressivamente a confluire in un unico grande antro in espansione costante (*figura 10*).

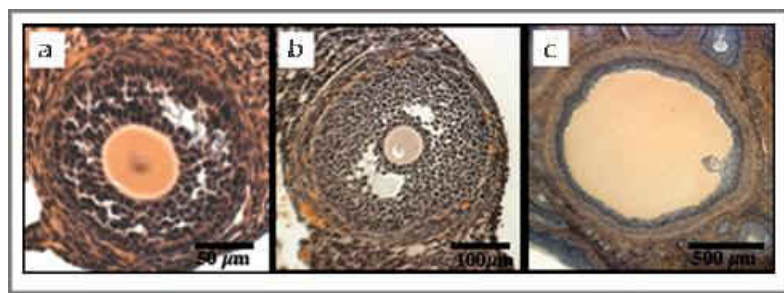


Figura 10. Immagine istologica: progressiva espansione dell'antro follicolare.

Questa matrice, nota come fluido follicolare, contiene quantità crescenti di sostanze diffuse dal plasma o secrete localmente dal follicolo quali proteoglicani, eicosanoidi, proteine, glicoproteine (Plendl, 2000) e ormoni steroidei (Barbieri et al., 1997).

E' proprio la miriade di sostanze contenute in questo liquido a svolgere un ruolo chiave nel processo di selezione e dominanza follicolare durante ciascun ciclo ovarico.

Il cambiamento strutturale associato alla formazione dell'antro corrisponde a precisi cambiamenti funzionali che trasformano il follicolo in una vera e propria ghiandola endocrina, incaricata di produrre quantità crescenti di ormoni (Webb et al., 2003).

La biosintesi locale di estrogeni innesca un meccanismo a cascata di autosensibilizzazione, basato sulla sintesi locale di nuovi recettori per l'FSH e per l'LH nei rispettivi comparti parietali.

Meccanismi sincroni con lo sviluppo follicolare guidano la cellula uovo all'acquisizione della sua maturità funzionale (Miyano et al. 2007). In particolare, in questa fase l'oocita si dispone eccentricamente nel follicolo circondato da cellule della granulosa ad esso strettamente associate, le cellule del cumulo ooforo; non aumenta le sue dimensioni ma acquisisce le caratteristiche necessarie per completare la maturazione meiotica e per lo sviluppo embrionale preimpianto (*figura 11*).



Figura 11. Immagine istologica: follicolo preovulatorio contenente la matrice del liquido antrale e l'oocita secondario circondato dalle cellule del cumulo ooforo.

Verso la fine della fase antrale, gli alti livelli di estrogeni e di FSH producono un altro cambiamento critico: le cellule della granulosa acquisiscono anche i recettori per l'LH.

Questo cambiamento predispone il follicolo a terminare la fase antrale ed a entrare, se le condizioni sono favorevoli, nelle fasi finali del suo sviluppo.

1.2.3 Follicolo preovulatorio

In questa fase il follicolo raggiunge le sue massime dimensioni e subisce modificazioni morfofunzionali che gli consentiranno di rispondere al picco di LH.

Le cellule della granulosa acquisiscono caratteristiche differenti in funzione della loro localizzazione: quelle che delimitano l'antra e compongono il cumulo ooforo proliferano restando poliedriche, mostrano ridotta attività steroidogenica e acquisiscono pochi recettori per LH; le cellule periferiche invece, cessano di proliferare e si allungano; queste cellule "murali" sono inoltre sede principale della steroidogenesi ed esprimono molti recettori per l'LH.

Il legame recettoriale dell'LH cambia le proprietà steroidogenetiche dei follicoli, che riducono la produzione di estrogeni e di recettori per l'FSH, a favore della sintesi di progesterone. La trasformazione delle cellule della granulosa in cellule luteiniche secernenti progesterone, consente la ripresa meiotica nell'oocita (Thomas e Vanderhyden, 2006). Dopo il picco di LH il gamete femminile completa infatti la prima divisione meiotica e diviene oocita secondario. A questo punto la cellula uovo inizia subito la seconda divisione meiotica, che viene però arrestata in metafase e riprenderà solo in caso di avvenuta fecondazione.

1.2.4 Ovulazione

Gli alti livelli di estrogeni prodotti dal follicolo preovulatorio stimolano una secrezione massiva di GnRH e di LH.

A livello follicolare, questo picco di LH induce le modificazioni morfofunzionali e la produzione di mediatori (prostaglandine, leucotrieni, ecc.) che determinano l'ovulazione.

In particolare, nelle ultime ore che precedono l'ovulazione si assiste ad un rapido aumento del volume follicolare, evento coadiuvato da una maggiore elasticità della parete follicolare, conseguente ad un cambiamento nei rapporti tra le cellule delle membrane parietali.

Le cellule della granulosa, del cumulo ooforo, e della teca esterna invasa da liquido edematoso, modificano infatti i loro rapporti di adesione cellulare, coadiuvando l'assottigliamento della parete follicolare, preludio alla successiva rottura (Stouffer et al., 2007).

Si viene quindi a creare un rigonfiamento visibile sulla superficie dell'ovaio che appare come un'area avascolare biancastra, nota come stigma: in questo punto il follicolo è separato dalla cavità peritoneale solo da uno strato molto sottile di cellule (*figura 12*).

Al momento dell'ovulazione l'ovocita, circondato dalla corona radiata viene espulso dall'ovaio, assieme al liquido antrale.

Nella rottura della parete follicolare svolgono un ruolo importante le prostaglandine (PG) le quali, sintetizzate principalmente dalle cellule della granulosa, raggiungono le massime concentrazioni intrafollicolari subito prima

della rottura del follicolo: il loro incremento non è quindi immediato al picco preovulatorio di gonadotropine.

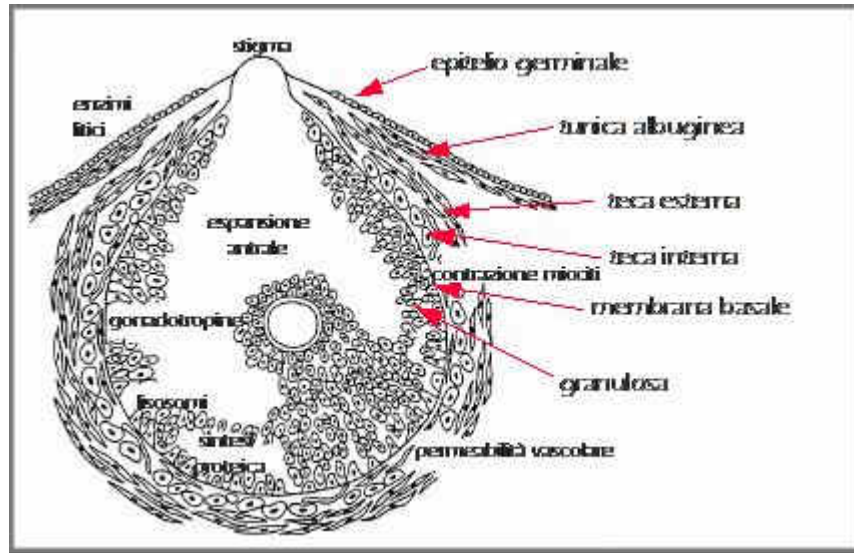


Figura 12. Modificazioni nel follicolo periovulatorio.

La $\text{PGF2}\alpha$ è responsabile delle contrazioni della parete follicolare nonché della stimolazione dell'attivatore del plasminogeno e quindi dell'incremento dell'attività plasminica (Stouffer et al., 2007).

La plasmina (Ohnishi et al., 2005) agisce sulla migrazione cellulare e sulla trasformazione tissutale che si realizzano solo dopo la rottura enzimatica della membrana basale: sia le cellule connettivali sia quelle endoteliali provenienti dalla teca interna migrano rapidamente nello strato della granulosa e iniziano la luteinizzazione.

1.2.5 Il corpo luteo

Successivamente alla rottura della membrana basale, la parete follicolare collassa determinando lo stravasamento di sangue dai capillari tecali all'interno del lume follicolare con formazione del corpo luteo emorragico (*figura 13*).

Il corpo luteo, la cui funzione principale è quella di produrre progesterone, origina pertanto da una riorganizzazione morfologica e biochimica del follicolo ovulato, intesa come un processo di differenziazione terminale delle sue cellule parietali che, in questa fase, escono dal ciclo cellulare (Stocco et al., 2007).

In particolare, le cellule della granulosa cessano di dividersi ma aumentano le loro dimensioni per accumulo di quantità crescenti di proteine, lipidi, organuli citoplasmatici e di un pigmento carotenoide, la luteina che conferisce un caratteristico colore giallastro al parenchima funzionale.

Il mantenimento del corpo luteo è sostenuto, per un periodo di tempo limitato, dall'LH. Se non avviene la fecondazione il corpo luteo regredisce attraverso cambiamenti strutturali e funzionali a carico del tessuto: sia i vasi sia le cellule steroidogeniche degenerano, mediante un processo di luteolisi che porta alla formazione del corpo albicante.



Figura 13. a) corpo luteo emorragico; b) corpo luteo maturo; c) corpo albicante.

Se avviene la fecondazione e l'impianto, il corpo luteo è invece trasformato in corpo luteo gravidico, il quale è implicato nel mantenimento della gravidanza (per un periodo variabile in funzione della specie) e nell'inibizione del ciclo estrale durante la gestazione; una sua inadeguata funzione comporta la morte embrionale o fetale.

1.3 Steroidogenesi

L'attività steroidogenetica del follicolo ovarico varia significativamente durante le fasi cicliche di sviluppo in funzione dei cambiamenti morfofunzionali delle cellule parietali, dell'espressione recettoriale e del corredo enzimatico (LinksMason e Franks, 1997).

Le cellule della granulosa e quelle della teca possiedono infatti un profilo steroidogenetico proprio, dipendente anche dalla compartimentalizzazione all'interno del follicolo che, limitando le strutture vascolari allo strato tecale, crea un microambiente sostanzialmente differente per i due tipi cellulari (*figura 14*).

Le gonadotropine FSH e LH agiscono sulle cellule bersaglio a seguito dell'interazione con recettori specifici, dando origine a una sequenza di segnali attraverso l'attivazione dell'adenilato ciclasi di membrana che comporta un aumento della sintesi di AMPc. Il risultato di questo aumento intracellulare dei livelli di AMPc è una serie di risposte fisiologiche che, tramite la fosforilazione di proteine chinasiche, regolano l'espressione e l'attivazione degli enzimi deputati alla sintesi steroidea (Havelock et al., 2004).

Gli steroidi ovarici androgeni, estrogeni e progesterone, derivano dal colesterolo, che può essere sintetizzato a partire da precursori a due atomi di carbonio, oppure trasportato dalle lipoproteine a bassa densità (LDL) circolanti.

La prima tappa della biosintesi steroidea è la trasformazione del colesterolo in pregnenolone, quindi prosegue secondo due vie catalizzate dagli enzimi steroidogenetici che fanno parte del gruppo delle ossidasi con citocromo P450.

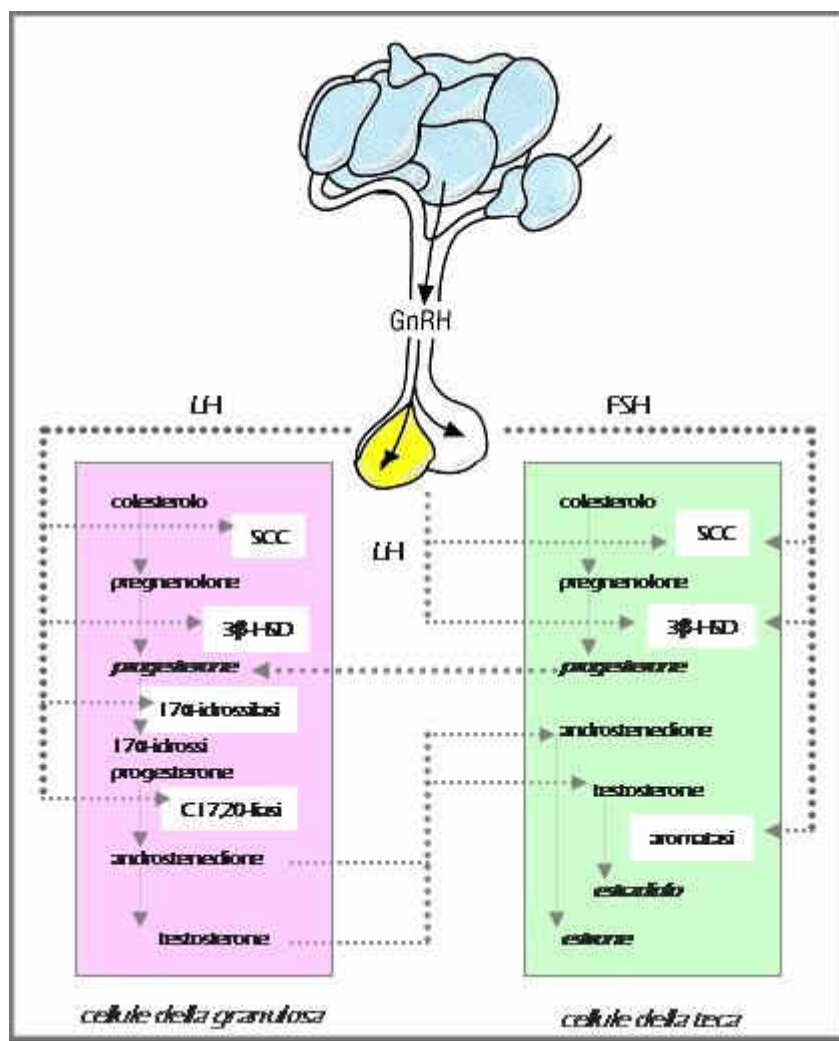


Figura 14. Tappe steroidogenetiche nel follicolo ovarico.

In particolare, la via dei 5α - 3β -idrossisteroidi porta alla formazione di 17β -idrossipregnenolone e di deidroepiandrosterone (DHEA), mentre la cascata dei δ^4 -3-chetosteroidi sintetizza direttamente il progesterone tramite l'azione delle 3α -idrossisteroidodeidrogenasi e δ^4 ,5-isomerasi. Questa via porta inoltre alla sintesi di 17β -idrossiprogesterone ed androstenedione. Gli androgeni androstenedione e testosterone, sono successivamente aromatizzati nei corrispondenti estrogeni, estrone ed estradiolo.

Dopo essere stati sintetizzati, gli steroidi vengono in parte veicolati nella circolazione sistemica ed in parte versati nel liquido antrale.

A livello ovarico si legano a specifici recettori intracellulari, generando segnali locali essenziali per lo svolgimento dei processi follicolari.

1.3.1 Estrogeni

Gli estrogeni naturali sono l'estradiolo-17 β (E2), il maggior prodotto della secrezione ovarica, l'estrone (E1) (12 volte meno potente), prodotto in piccole quantità, e l'estriolo (80 volte meno potente), derivato dall'ossidazione delle altre due molecole. A livello ovarico, l'E2 e l'E1 originano rispettivamente dal testosterone e dall'androstenedione, prodotti dalle cellule tecali; questi androgeni diffondono mediante gradiente di concentrazione attraverso la membrana basale per essere aromatizzati nello strato della granulosa dove è localizzato l'enzima l'aromatasi (Jamnongjit e Hammes, 2006) (figura 15).

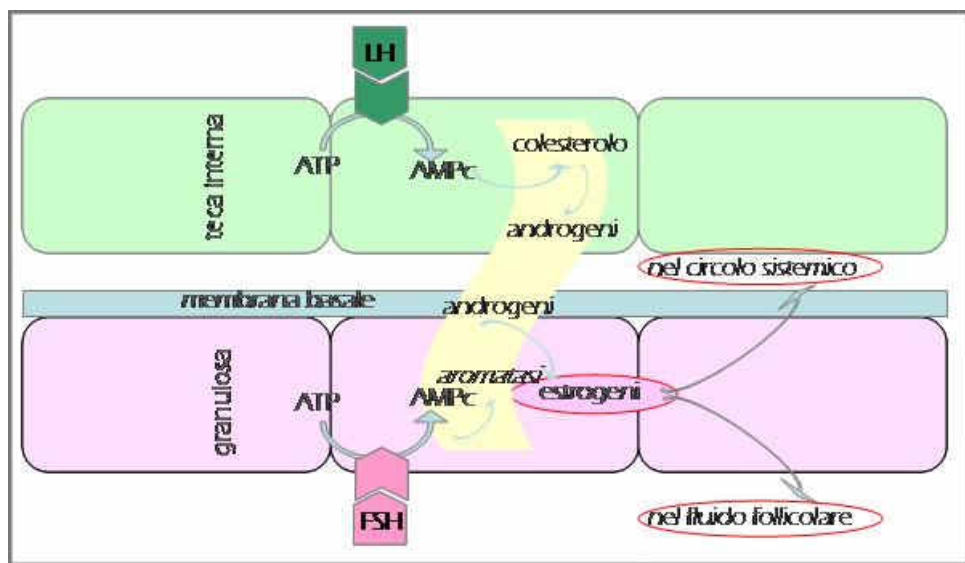


Figura 15. Sintesi degli estrogeni nella parete del follicolo ovarico.

A livello delle cellule della granulosa sono inoltre presenti enzimi responsabili del catabolismo degli estrogeni primari, che generano altre molecole, genericamente

indicate come catecolestrogeni (Hammond et al., 1986), in riferimento all'anello catecolico che si forma dopo l'ossidazione dell'anello aromatico A.

Gli estrogeni intervengono nella fisiologia ovarica stimolando la proliferazione delle cellule della granulosa e svolgendo quindi in ultima analisi un effetto di salvataggio dall'atresia follicolare. Il processo di differenziazione finale delle cellule della granulosa, dipendente dall'FSH, necessita infatti dell'azione di potenziamento dell'estradiolo da esse stesse prodotto.

Couse e collaboratori, (2005) hanno dimostrato che l'azione dell'estradiolo, mediata dal suo recettore specifico ER α , è vitale per la differenziazione delle cellule della granulosa indotta dall'FSH; in particolare, l'assenza del recettore ER α si associa a mancata differenziazione cellulare, attività enzimatica alterata e insufficiente espressione dei recettori per le gonadotropine.

Attraverso un meccanismo di feedback positivo, l'estradiolo promuove infatti l'espressione dei recettori sia specifica per gli estrogeni (Richards, 1980) sia per gli androgeni ed i progestinici (Petraglia et al., 1998), nonché per le gonadotropine (Louvet e Vaitukaitis, 1976).

In proposito, utilizzando topi transgenici, è stato dimostrato (Huynh et al., 2004) che la mancata espressione degli enzimi aromatasici è associata ad un'eccessiva secrezione di gonadotropine quale probabile conseguenza della perdita del controllo estrogenico.

Infatti, gli estrogeni sono in grado di esercitare un'azione diretta sul rilascio delle gonadotropine: esempio di eccellenza è il picco preovulatorio dell'LH che avviene in risposta al raggiungimento di elevati livelli di estradiolo nell'antro follicolare,

garantendo l'avvento dell'ovulazione solo quando lo sviluppo del follicolo preovulatorio è completato.

1.3.2 Progesterone

La biosintesi di progesterone, inizialmente stimolata dall'FSH, aumenta in risposta al picco di LH, quando inizia la differenziazione delle cellule della granulosa in cellule luteiniche ed aumenta la permeabilità della membrana basale alle lipoproteine .

Durante la luteinizzazione aumenta fortemente l'espressione della "steroidogenic acute regulatory protein" (StAR), una proteina che stimola il passaggio del colesterolo dal citoplasma fino alla membrana interna del mitocondrio, dove avverrà la conversione in pregnenolone da parte dell'enzima citocromo P450 (CYP 11a).

Il rapido e consistente aumento della produzione di progesterone che avviene a seguito del picco di LH suggerisce un ruolo importante di questo ormone nel promuovere la maturazione dell'oocita e nell'ovulazione (Jamnongjit et al., 2005).

Sembra infatti essenziale per garantire l'ovulazione indotta dalle gonadotropine, come dimostra la mancata ovulazione in seguito a stimolazione con gonadotropine in topi deleti dei recettori funzionali per il progesterone (Jamnongjit e Hammes, 2006).

La massima sintesi di progesterone ovarico è però sostenuta dal corpo luteo, che impedisce una nuova ondata follicolare attraverso un meccanismo di feedback negativo sul rilascio delle gonadotropine ipofisarie.

La sua produzione diviene inoltre essenziale, in quasi tutte le specie animali, qualora avvenga la fecondazione per il mantenimento della gravidanza (Bortolami, 2000).

1.3.3 Androgeni

La sintesi degli androgeni avviene nel comparto tecale grazie all'azione stimolatoria dell'LH. Il sistema enzimatico coinvolto, ovvero la 17 β -idrossilasi/17-20 desmolasi (CYP17), è modulato dagli estrogeni, che attraverso un feedback intrafollicolare sono quindi in grado di agire sulla disponibilità del loro substrato aromatizzabile di sintesi.

Gli androgeni sono in grado di modulare l'effetto dell'FSH sulle cellule della granulosa, ad esempio amplificando l'attività aromatasica: tale azione è mediata da specifici recettori degli androgeni (AR), la cui espressione rappresenta quindi un requisito indispensabile per un normale sviluppo follicolare (Yeh et al., 2002).

1.4 Il fluido follicolare

Il liquido antrale è un trasudato plasmatico contenuto nella cavità del follicolo ovarico, costituito da acqua, soluti e molecole prodotte dalle cellule parietali (Nandi et al. 2007) che, nel suo complesso, rappresenta l'ambiente nel quale si sviluppa l'oocita (*tabella 1*).

L'espansione delle dimensioni follicolari sono da attribuirsi prevalentemente alla creazione di un gradiente osmotico attraverso la parete follicolare, che comporta lo spostamento di acqua dal sangue alla cavità antrale.

Il fluido follicolare contiene infatti proteine e molecole solubili della matrice extracellulare (Irving-Rodgers et al. 2006), inclusi proteoglicani quali ad esempio inibitori dell'inter- α tripsina, perclani e ialuroniani che nel loro insieme rappresentano delle molecole osmoticamente attive. L'equilibrio del passaggio delle proteine totali non sembra peraltro modificarsi durante la crescita antrale.

Per quanto riguarda i carboidrati, diversi autori (Orsi et al. 2005; Nandi et al. 2007) hanno evidenziato che il loro contenuto follicolare differisce in funzione del metabolismo glicolitico delle cellule della parete.

Il glucosio rappresenta infatti la principale fonte energetica delle cellule della granulosa, e viene metabolizzato attraverso vie anaerobiche che portano alla formazione di acido lattico (Leroy et al. 2004).

L'aumento della sua concentrazione antrale, concomitante alla crescita follicolare, potrebbe dipendere da una diminuzione della sua metabolizzazione (Nandi et al. 2007), che esita in una produzione inferiore di acido lattico nel liquido stesso.

Nel liquido follicolare le concentrazioni dei lipidi, quali trigliceridi, fosfolipidi e colesterolo sono inferiori a quelle plasmatiche e tendono a decrescere durante la maturazione follicolare (Chang et al., 1976).

Nei follicoli piccoli i trigliceridi rappresentano prodotti metabolici che si accumulano come fonti energetiche alternative, in conseguenza alla impermeabilità della membrana basale (Grummer e Carrol, 1988).

Il colesterolo, derivante dalla sintesi cellulare dall'acetato e dal passaggio dalle lipoproteine plasmatiche, diminuisce probabilmente a seguito dell'aumento dell'attività steroidogenetica (Thangavel e Nayeem, 2004), poiché rappresenta il substrato di sintesi stereoidea delle cellule della granulosa.

Relativamente alle concentrazioni di ioni durante la crescita follicolare, si assiste ad un aumento lineare del calcio e del sodio (Bordoloi et al. 2001).

Il calcio svolgerebbe un ruolo nella trasduzione dei segnali intracellulari coinvolti nelle dinamiche steroidogenetiche; il sodio contribuirebbe alla creazione del gradiente osmotico che facilita l'accumulo di liquido antrale (Sharma et al. 1995).

Durante la crescita follicolare si evidenzia inoltre una diminuzione dei livelli di magnesio. Poiché questo ione è un antagonista del calcio, questa riduzione faciliterebbe l'azione del calcio nei follicoli grandi (Kalmath 2000), mentre nei follicoli piccoli potrebbe stimolare la mitosi delle cellule follicolari attraverso la formazione di trombina (Bordoloi et al., 2001).

Il fluido antrale rappresenta un indice dell'attività steroidogenetica, poiché riflette le variazioni della sintesi ormonale follicolare.

Nello specifico, il suo profilo ormonale è ampiamente rappresentato dagli estrogeni, soprattutto estradiolo-17 β , le cui concentrazioni aumentano

all'aumentare del diametro follicolare e diminuiscono in corso di fenomeni atresici (Dehennin, 1990); inoltre dalla loro metabolizzazione originano i catecolestrogeni, dei quali si parlerà più ampiamente in seguito.

Quando inizia la luteinizzazione, nel fluido follicolare aumenta la concentrazione di progesterone raggiungendo livelli micromolari (Dehennin, 1990); sono inoltre stati identificati diversi metaboliti progestinici e del pregnenolone (Dehennin et al., 1987a), derivanti dall'attività di varie idrossilasi e reduttasi steroidee presenti nel liquido stesso.

Tra gli androgeni presenti nel liquido di follicoli preovulatori umani ed equini, l'androstenedione, che occupa una posizione chiave nella steroidogenesi follicolare, è il più abbondante (Dehennin et al., 1987b). Sono inoltre presenti i metaboliti della via sintetica del pregnenolone solfato, quali il diidroepiandrosterone solfato e il 5-androstano-3 β (Dehennin e Scholler, 1987b).

L'aumento degli androgeni nella cavità antrale è inoltre associato al fenomeno dell'atresia, conseguente ad una diminuita attività aromatasica da parte della membrana della granulosa (Dehennin, 1990).

Nel fluido follicolare di diverse specie sono stati evidenziati livelli di cortisolo molto inferiori a quelli circolanti (Fateh et al., 1989); sono stati inoltre quantificati diversi metaboliti corticosteroidi quali il deossicorticosterone, l'11-deossicortisolo e il 21-idrossipregnenolone, la cui presenza presuppone un'ampia specificità dell'enzima follicolare 21-idrossilasi per i substrati 17-idrossiprogesterone e pregnenolone.

Oltre agli enzimi coinvolti nella sintesi e nella metabolizzazione steroidea descritti precedentemente, nel liquido follicolare è stata identificata l'azione di varie idrossilasi, come il complesso enzimatico 17-idrossilasi/C-17,20, la 20-

chetosteroidoreduttasi/20-idrossitestosteroidodeidrogenasi e la 16 α -idrossilasi, identificati quali componenti del corredo enzimatico operante nel fluido antrale (Sano et al., 1981).

COSTITUENTE	UNITA'	follicoli PICCOLI ($< 3\text{ mm}$)	follicoli MEDI ($3\text{-}5\text{ mm}$)	follicoli GRANDI ($> 5\text{ mm}$)
Proteine totali	g/dl	6,0 \pm 0,1	6,0 \pm 0,1	6,0 \pm 0,1
Acido urico	mg/dl	0,5 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2
Creatinina	mg/dl	1,4 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1
Fosf. alcalina	U/l	229 \pm 13	218 \pm 12	188 \pm 15
GOT	U/l	74 \pm 19	67 \pm 10	43 \pm 8
Glucosio	mg/dl	37 \pm 4	48 \pm 2	52 \pm 3
Trigliceridi	mg/dl	19 \pm 2	16 \pm 1	15 \pm 2
Fosfolipidi	mg/dl	56 \pm 4	58 \pm 4	46 \pm 4
Colesterolo	mg/dl	36 \pm 1	35 \pm 2	28 \pm 1
Na	mEq/l	134 \pm 2	139 \pm 1	141 \pm 0
K	mEq/l	5,3 \pm 0,6	3,8 \pm 0,7	2,6 \pm 0,2
Ca	mg/dl	7,8 \pm 0,4	8,6 \pm 0,2	8,8 \pm 0,2
P	mg/dl	9,4 \pm 0,4	8,8 \pm 0,3	8,3 \pm 0,4
Estrogeni	ng/ml	9,0 \pm 1	75,0 \pm 5	250,0 \pm 10
Progesterone	ng/ml	100,0 \pm 2	115,0 \pm 25	215,0 \pm 55
Testosterone	ng/ml	14,0 \pm 1	-	39,0 \pm 1
AMPc	pmol/ml	1,5 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1	5,6 \pm 0,2

Tabella 1. Composizione del fluido antrale porcino prelevato da follicoli di diverse dimensioni (da Chang et al., 1976). I dati sono espressi come media \pm SEM.

Le fosfatasi acide e alcaline, enzimi lisosomiali coinvolte nel trasporto attivo transmembranario del fosfato, nella sintesi proteica e nel turnover del DNA nucleico, diminuiscono nel liquido antrale con l'aumento del diametro follicolare, verosimilmente in conseguenza al cambiamento del profilo ormonale nel microambiente follicolare (Nandi et al., 2007).

L'aumento di attività dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) nel liquido antrale indica una prima fase di degenerazione follicolare (Wise *et al.* 1987), infatti alti livelli di LDH si associano ai primi segni di atresia.

1.5 Angiogenesi ovarica: rimodellamento dell'architettura vascolare

L'importanza della genesi di nuovi vasi (angiogenesi) nel sostenere la crescita e lo sviluppo follicolare è da tempo nota (Clark, 1900): l'intenso rimodellamento che si accompagna sia allo sviluppo sia alla regressione dei follicoli può realizzarsi grazie a sofisticati meccanismi che prevedono radicali cambiamenti del letto vascolare.

A livello ovarico, lo sviluppo di nuovi vasi si indirizza infatti verso le strutture in accrescimento mentre quelle in regressione sono accompagnate da una progressiva involuzione capillare.

Numerosi studi (Shimizu, 2006; Taylor et al., 2007) confermano che i follicoli ovulatori presentano una teca più vascolarizzata, che conferisce loro una maggior capacità di captazione delle gonadotropine e dei substrati trofici rispetto agli altri follicoli antrali (*figura 16*).



*Figura 16. a) follicolo preovulatorio, b) vascolarizzazione
tecale di un follicolo preovulatorio.*

Ne consegue che lo sviluppo del follicolo preovulatorio è associato all'aumento dei vasi sanguigni, della loro tortuosità e diametro nonché a vasodilatazione (Acosta, 2003).

Inoltre la vascolarizzazione avviene secondo una architettura che tiene conto delle diverse necessità funzionali (Fraser e Duncan, 2005) (figura 17a,b): nel follicolo dominante la proliferazione capillare sembra interessare dapprima la regione apicale, quindi quella equatoriale o basale dello strato capillare interno; l'apporto ematico aumenterebbe pertanto gradualmente a partire dalla base del follicolo, in parallelo con la concentrazione plasmatica di estradiolo (Shimizu et al., 2003).

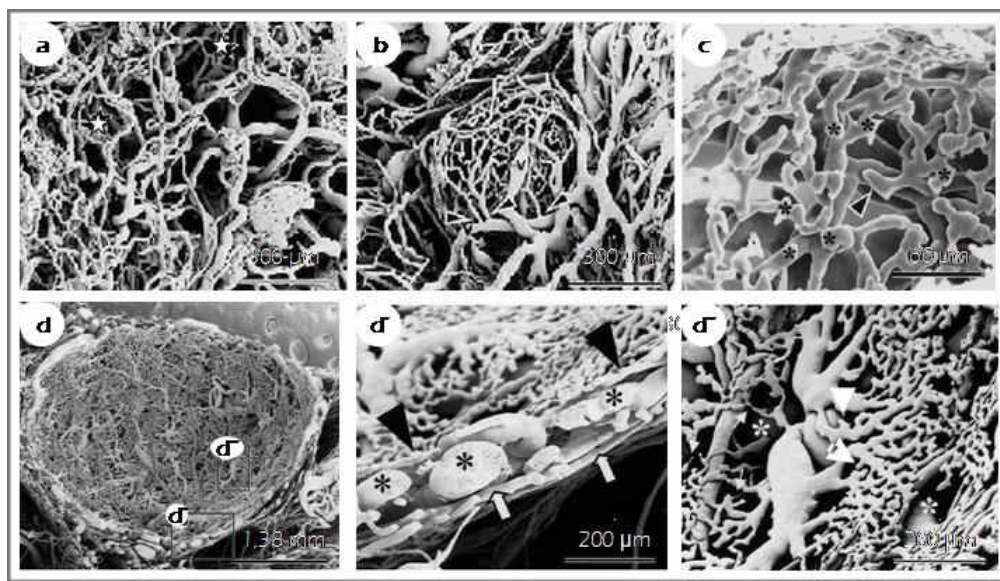


Figura 17a. Architettura vascolare di follicoli porcini. a: ☆ follicoli primordiali o primari; b: follicolo antrale piccolo, ► indica il punto di confluenza dei capillari follicolari nella venula (V); c : plesso vascolare di follicoli antrali piccoli (500 μm di diametro), * gemme capillari, ► ramificazioni capillari d: follicolo antrale medio; d': ingrandimento delle aree selezionate nella figura d, ► plesso capillare interno, * vasi medi, ⇨ rete capillare esterna; d'':ingrandimento delle aree selezionate nella figura d, ► plesso capillare interno, ⇨ rete capillare esterna (da Jiang et al., 2002).

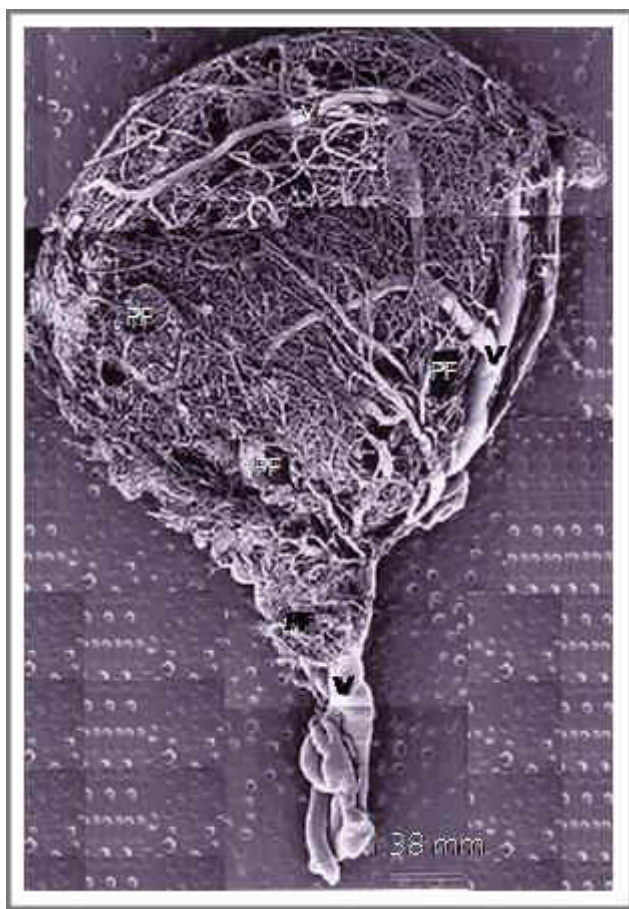


Figura 17b. Architettura vascolare di un follicolo preovulatorio porcino,
 PF: follicoli preantrali; a;V; v: vasi arteriosi e venosi (da Jiang et al., 2002).

Poiché i vasi non possono superare la barriera rappresentata dalla membrana basale e restano quindi confinati allo strato tecale più esterno, l'oocita, situato nel comparto più interno, si allontana progressivamente dal supporto vascolare durante lo sviluppo dello strato della granulosa.

Il supporto trofico dipende quindi da un processo di diffusione attraverso la parete avascolare e l'efficienza di questo meccanismo è inversamente proporzionale allo spessore della stessa che progressivamente aumenta: si rende quindi necessario un

meccanismo compensatorio, rappresentato da un ulteriore aumento della densità vascolare (Acosta, 2007).

Al contrario, durante la fase precoce del processo atresico si è osservato (Jablonka-Shariff et al., 1994) un arresto della proliferazione dell'endotelio, concomitante alla diminuzione della vascolarizzazione tecale (*figura 18*).

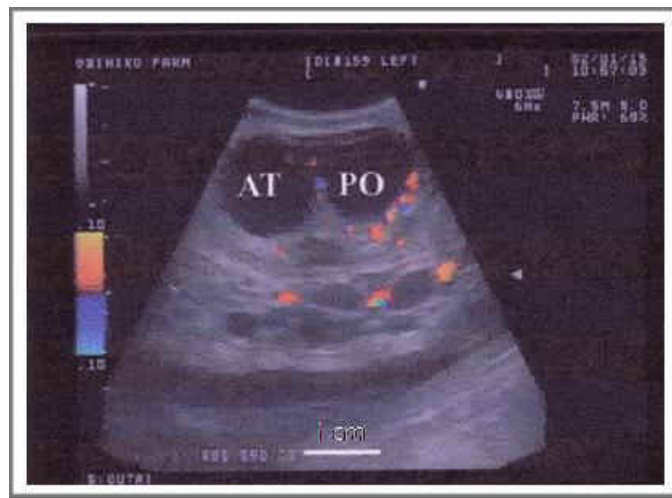


Figura 18. Immagine al color doppler: differenza di vascolarizzazione tra due follicoli delle stesse dimensioni, uno atresico (AT) e uno preovulatorio (PO) (da Acosta et al., 2003).

La stretta relazione tra gli stadi dello sviluppo follicolare e l'attività angiogenetica sarebbe avvalorata dall'osservazione che la proliferazione endoteliale risulta stimolata da medium di coltura di cellule tecali prelevate da follicoli a stadi di sviluppo ben definiti (Barboni et al., 2000).

Le cellule della granulosa eserciterebbero un effetto mitogeno sulle cellule endoteliali solo quando prelevate da follicoli non atresici appena prima dell'ovulazione, contribuendo al mantenimento della vascolarizzazione e quindi

della vitalità del follicolo preovulatorio, nonché al reclutamento di vasi sanguigni per la formazione del corpo luteo (Redmer et al., 1991).

Lo sviluppo vascolare nell'ovaio aumenta soprattutto nel periodo post-ovulatorio quando si assiste alla formazione del corpo luteo (Reynolds et al., 2000): alla degenerazione della membrana basale che separa le cellule tecali da quelle della granulosa consegue un marcato aumento centripeto dell'angiogenesi.

Questo fenomeno determina l'avvio della vascolarizzazione della granulosa, la penetrazione in essa di alcune cellule della teca interna e la formazione del coagulo al centro del follicolo ovulato.

In questo modo inizia la luteinizzazione: si forma un nucleo di fibrina circondato da cellule della granulosa frammiste a cellule della teca interna, ed uno strato esterno di cellule tecali fibrose.

La maturazione del nuovo letto vascolare è caratterizzata dal reclutamento di cellule murali, quali cellule muscolari lisce e periciti per stabilizzare le pareti vasali. Si è osservato che i periciti migrano nello strato della granulosa dai capillari tecali e proliferano nel corpo luteo che si sta formando; il grado di maturazione dei vasi influenza la loro integrità, la funzione e la risposta a fattori angiogenetici e anti-angiogenetici, nonché la loro degenerazione.

La rete capillare del corpo luteo maturo è così estesa che la maggior parte delle cellule parenchimatose sono adiacenti ad uno o più capillari, e più dell'85% delle cellule che proliferano durante la crescita dello stesso sono rappresentate da cellule endoteliali.

Qualora non sia avvenuta la fecondazione, la regressione del corpo luteo ciclico comprende la degenerazione sia delle cellule vasali sia di quelle steroidogenetiche.

L'involuzione strutturale del corpo luteo inizia con il cedimento delle "tight junctions" delle cellule endoteliali e con la rottura delle barriere costituite dalla parete vasale; conseguentemente, le cellule endoteliali dei capillari si staccano dalla membrana basale ed occludono i vasi ematici più piccoli. I capillari non sono più evidenziabili e compaiono delle arteriole con una parete più spessa, apparentemente come conseguenza di un aumento delle cellule muscolari lisce.

Mentre porzioni del letto capillare luteale degenerano durante le fasi iniziali della luteolisi, i microvasi più grandi vengono mantenuti, forse per facilitare il riassorbimento della massa luteinica e la regressione vascolare del corpo albicante.

Nel loro insieme, queste dinamiche vascolari sottolineano la peculiarità delle strutture ovariche quali eccezionali sedi fisiologiche di cellule endoteliali attive, avendo una capacità mitotica uguale o superiore a quella delle cellule endoteliali tumorali (Neeman et al., 1997).

Cellule tecali, della granulosa e luteiniche, producono sostanze diffusibili, quali fattori di crescita e citochine, che scatenano i cambiamenti vascolari ovarici (Fraser e Duncan, 2005), evidenziando una regolazione locale del processo angiogenetico.

1.5.1 Il processo angiogenetico

L'angiogenesi rappresenta il principale processo di vascolarizzazione durante lo sviluppo embrionale (Carmeliet, 2003), mentre nell'individuo adulto è fisiologicamente limitato alle sole sedi che subiscono variazioni morfofunzionali dinamiche quali ad esempio i tessuti riproduttivi femminili (Fraser e Duncan, 2005) e ai processi di riparazione tissutale (Eming et al., 2007).

Il processo angiogenetico definisce la genesi di nuove strutture vascolari perfettamente organizzate mediante rimodellamento del plesso primario, attraverso una sequenza di eventi (Jaffe, 2000) così riassumibili (*figura 19*):

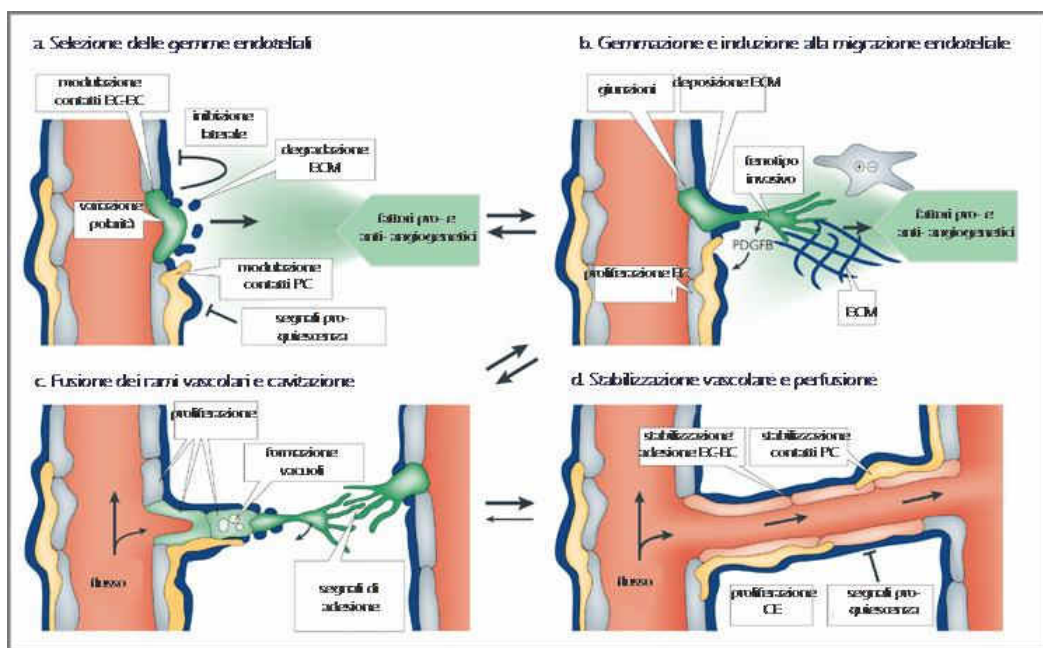


Figura 19. Fasi del processo angiogenetico.

Attivazione delle cellule endoteliali

L'angiogenesi si attiva rapidamente in seguito a diminuzione della tensione di ossigeno che comporta il rilascio di mediatori specifici in grado di trasdurre il segnale ipossico (Ruas et al., 2007). La partecipazione delle cellule endoteliali a tale fenomeno è condizionata dall'aumento della permeabilità vasale cui consegue la destabilizzazione dei vasi preesistenti per perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali.

Destabilizzazione del plesso primario

La genesi di nuovi capillari è strettamente associata all'attivazione di un processo invasivo che conferisce alle cellule endoteliali la capacità di degradare la membrana basale e di migrare nello stroma del tessuto circostante (Lamalice et al., 2007). La modulazione delle interazioni tra matrice extracellulare e cellule vascolari richiede la cooperazione di due sistemi integrati: il PA (attivatore del plasminogeno) (Binder et al., 2007) e le MMPs (metalloproteinasi della matrice) (Rundhaug et al., 2005), enzimi rilasciati negli spazi extravasali dalle cellule endoteliali attivate.

Migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali

A seguito della degradazione proteolitica della matrice extracellulare, le cellule endoteliali "leader" iniziano a migrare attraverso la matrice guidate da un delicato equilibrio tra fattori pro- e anti-angiogenetici (Lamalice et al., 2007).

Interazioni cellula-cellula e cellula-matrice

Sulla superficie delle cellule endoteliali sono presenti aree definite “focal adhesion-associated proteins” dove coesistono fibre di actina polimerizzata, molecole di adesione e proteine adattatrici (Urbich et al., 2002). Queste zone sono coinvolte non solo meccanicamente nell’adesione, ma rappresentano anche la sede di origine del segnale che attiva o inibisce i processi cellulari di proliferazione, sopravvivenza e migrazione.

La neoformazione capillare prevede una prima formazione di cordoni endoteliali solidi che successivamente acquisiscono un lume e diventano funzionali (Gale e Yancopoulos, 1999): in questo processo di cavitazione giocano un ruolo fondamentale le molecole di adesione superficiali che consentono il corretto orientamento delle cellule endoteliali in funzione della loro polarità attraverso meccanismi di interazione cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare. Tali molecole mantengono sia i rapporti intercellulari che quelli tra le cellule e la membrana basale, guidando la migrazione endoteliale alla successiva riorganizzazione che esita nella neoformazione vascolare (Blavier et al., 1999).

Rimodellamento e maturazione vascolare

Le cellule endoteliali sono in grado di iniziare autonomamente ma non di completare il fenomeno dell’angiogenesi: la maturazione vascolare richiede infatti il richiamo di cellule subendoteliali di supporto quali periciti, fibroblasti e cellule della muscolatura liscia.

Al fine di consentire l’espansione del vaso in formazione è inoltre necessaria la deposizione di proteoglicani da parte delle cellule endoteliali; la ciclica inibizione e

riattivazione dell'attività proteolitica delle cellule endoteliali che formano l'apice della struttura vascolare ne garantisce l'allungamento (Carmeliet, 2000).

Formazione di una rete vascolare

Il sistema vascolare così formato è soggetto ad ulteriore rimodellamento per dare origine ad una struttura organizzata in vasi di diverse dimensioni grazie a processi di potatura dei rami in eccesso, regressione di alcuni vasi e fusione di altri in strutture di maggiore diametro. Inoltre, abbozzi capillari contigui possono formare una rete tramite anastomosi.

In particolare, il rimodellamento può avvenire per gemmazione, che segue il percorso angiogenetico precedentemente descritto, e per intussuscezione, con formazione di nuovi vasi sanguigni in seguito all'organizzazione di pilastri di matrice extracellulare periendoteliale che si invaginano a livello intraluminale (Jaffe, 2000).

L'incremento del diametro e della lunghezza dei vasi avviene invece attraverso intercalazione o assottigliamento delle cellule endoteliali e fusione di vasi preesistenti.

Quiescenza endoteliale

Nella struttura vascolare matura e stabilizzata le cellule endoteliali diventano quiescenti e sopravvivono per anni, conservando la potenzialità di esprimere un programma angiogenetico latente attivabile tramite appropriati segnali (Montesano et al., 1986).

In un normale individuo adulto solo lo 0,01% delle cellule endoteliali presenti sono in fase di attiva proliferazione (Hobson e Denkamp, 1984), e in questo caso il turnover è di soli sette giorni (*figura 20*).

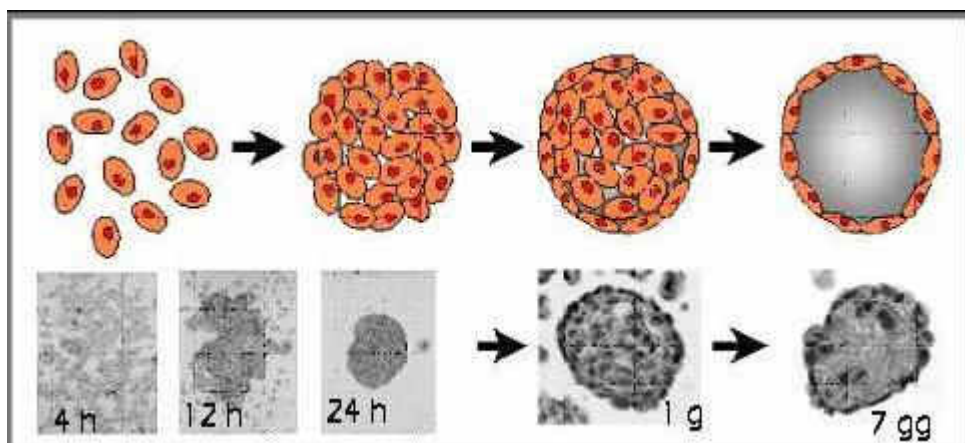


Figura 20. Turnover delle cellule endoteliali.

Apoptosi endoteliale

L'apoptosi è un processo fisiologico di morte cellulare programmata coinvolta nella morfogenesi, nel rimodellamento vascolare, e sembra essenziale nel controllo delle fasi iniziali dell'angiogenesi (Nor et al., 1999).

Questo fenomeno è indotto dalla privazione di nutrienti e di fattori trofici, possibile conseguenza dell'ostruzione del lume vascolare per fenomeni spastici, trombotici o risultante da gruppi di cellule endoteliali morte, oppure dall'inibizione dell'interazione con le macromolecole della matrice.

I meccanismi di controllo dell'apoptosi assumono particolare importanza nelle cellule coinvolte nel processo angiogenetico al fine di evitare la perdita di adesione al substrato durante la degradazione della matrice extracellulare (*figura 21*): per

questa ragione i segnali che inducono la migrazione endoteliale sono spesso anche promotori della sopravvivenza cellulare (Stupack et al., 2001).

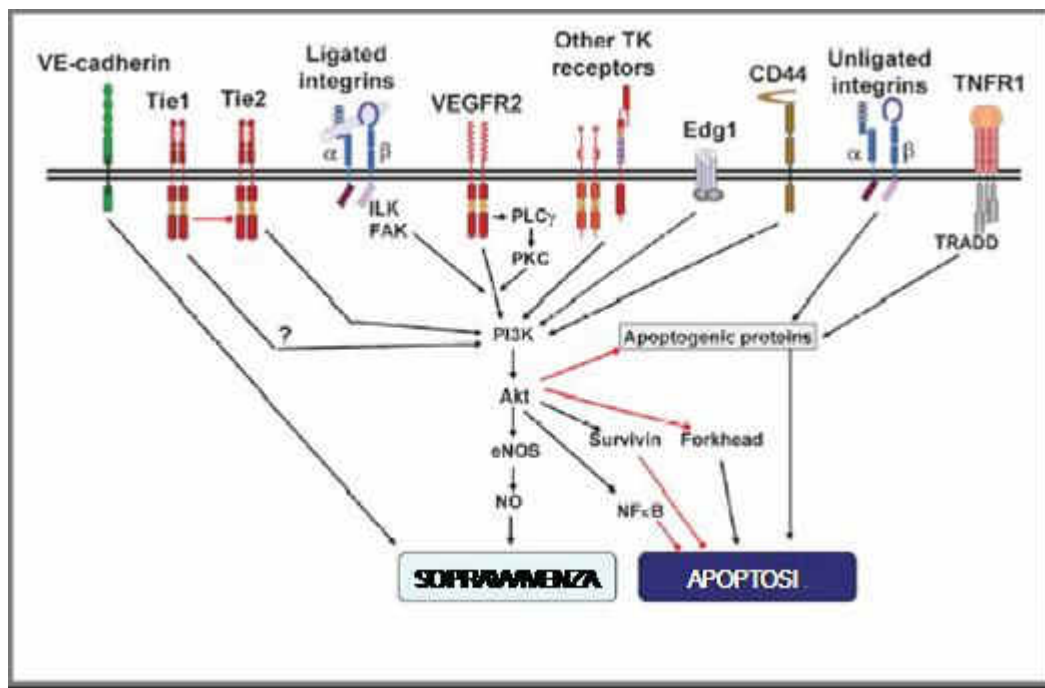


Figura 21. Possibili vie di trasduzione dei segnali di sopravvivenza/apoptosi nelle cellule endoteliali.

1.5.2 VEGF e angiogenesi ovarica

A causa delle potenziali implicazioni cliniche e terapeutiche, i meccanismi molecolari e cellulari che sottendono alle dinamiche angiogenetiche sono stati estensivamente studiati nel corso degli ultimi anni, rendendo possibile l'isolamento e la caratterizzazione di numerosi fattori angiogenetici.

Tra questi occupa una posizione di rilievo il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), isolato negli anni '70 da tessuto neoplastico, e inizialmente denominato Vascular Permeability Factor (VPF) per la sua capacità di aumentare la permeabilità vasale alle proteine (Dvorak et al., 1979).

Prodotto principalmente dalle cellule endoteliali (Klagsbrun e D'Amore, 1996), e a livello follicolare dalle cellule della granulosa (Barboni et al., 2000), il VEGF svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'angiogenesi sia fisiologica che patologica, ed è noto quale principale fattore angiogenetico ovarico. In particolare all'interno della famiglia del VEGF, il VEGF-A (o VEGF) è quello principalmente coinvolto nella neovascolarizzazione ovarica, dove tra le varie isoforme possibili il VEGF 165 è quello maggiormente espresso (Tesone et al., 2005).

A differenza degli studi in vivo, che sono risultati di notevole utilità per studiare il coinvolgimento di tale fattore nella neovascolarizzazione (Klagsbrun e D'Amore, 1991), le tecniche in vitro hanno consentito di studiarne l'azione sulle singole fasi del processo angiogenetico, valutando in particolare i suoi effetti sulla migrazione, proliferazione e produzione di proteasi nelle cellule endoteliali.

Inoltre, metodiche di ibridazione in situ (Wulff et al., 2002) e di immunoistochimica (Otani et al., 1999) sono state largamente impiegate per investigare la distribuzione

dei recettori VEGFR, l'espressione dell'RNA per il VEGF e la localizzazione della proteina a livello ovarico, il cui pattern, a parte qualche differenza di specie, sembra piuttosto conservato.

L'attività del VEGF sembra mediata principalmente da due recettori tirosinchinasici transmembranari, il VEGFR-1 (Flt-1) e il VEGFR-2 (flk-1/KDR) (*figura 22*), localizzati a livello delle cellule endoteliali dei vasi dello stroma ovarico e dei capillari che irrorano la teca (Geva e Jaffe, 2000); questi sono costituiti da sette domini extracellulari Ig-like, da una sequenza chinastica inserzionale transmembranaria e da un dominio citoplasmatico. A questi si aggiunge una forma solubile del VEGFR-1 (sFlt-1) il quale lega il VEGF ma non ne trasduce il segnale poiché privo del dominio intracellulare tirosinchinasico (Yamaguchi et al., 2002).

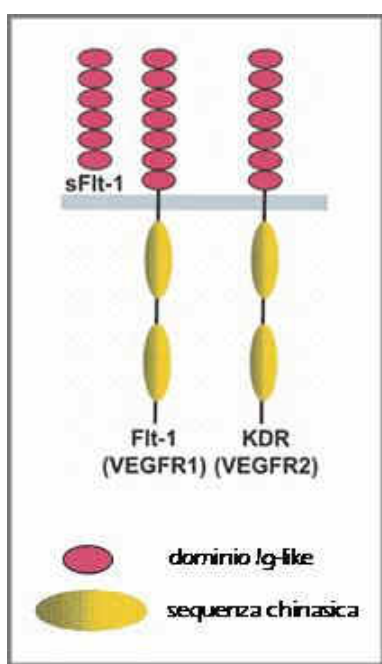


Figura 22. Recettori per il VEGF presenti a livello ovarico.

Il VEGFR-2, pur presentando una minor affinità per il VEGF rispetto al VEGFR-1, sembra mediare le principali funzioni biologiche di questo fattore di crescita, che si evidenziano in un tempo variabile da ore a giorni ed includono imponenti cambiamenti morfologici e citoscheletrici accompagnati dalla migrazione e proliferazione cellulare (Dvorak, 2002). A livello molecolare questo fattore incrementa l'espressione di geni che codificano per la sintesi di numerose proteine proangiogenetiche. In particolare, il VEGF favorirebbe il mantenimento dell'equilibrio fra sopravvivenza/apoptosi delle cellule endoteliali (Claesson-Welsh, 2003) attraverso l'induzione di fattori mitogeni (Benjamin et al., 1999) e proteine antiapoptotiche (Bcl-2 e A1) (Gerber et al., 1998), e rallentando il processo di senescenza (Watanabe et al., 1997).

Nel follicolo primordiale, l'espressione del VEGF è limitata alle sole cellule tecali (Yamamoto et al., 1997); viene successivamente evidenziata anche nello strato della granulosa in follicoli secondari, ovvero quando inizia a svilupparsi una prima vascolarizzazione tecale. Poiché questo stadio di sviluppo follicolare è indipendente dalle gonadotropine, la loro inibizione non sembra compromettere la produzione di VEGF (Taylor et al., 2004). L'espressione del VEGF sembra poi aumentare progressivamente nelle cellule della granulosa alla fine della fase di follicolo secondario e follicolo terziario, mentre l'espressione nella teca si riduce e rimane piuttosto costante. Nei follicoli che esprimono i recettori per le gonadotropine, l'espressione del VEGF viene stimolata dalle gonadotropine in vitro (Christenson et al., 1997), studi in vivo documentano inoltre che l'espressione del VEGF viene inibita dall'utilizzo di antagonisti del GnRH (Taylor et al., 2004).

In cellule della granulosa di follicoli antrali suini di diverso diametro sono stati osservati livelli crescenti di RNAm per il VEGF all'aumentare delle dimensioni follicolari (Mattioli et al., 2001). Anche il dosaggio del VEGF nei media di coltura di cellule della granulosa suine prelevate da follicoli antrali di diverso diametro (Grasselli et al., 2002) evidenzia un incremento significativo della sua produzione all'aumentare delle dimensioni follicolari.

Il progressivo aumento di produzione di VEGF da parte delle cellule della granulosa di follicoli antrali fino allo stadio preovulatorio, esiterebbe in un accumulo sempre maggiore di questo fattore nel fluido follicolare (Barboni et al., 2000), generando uno stimolo angiogenetico sempre più intenso per lo sviluppo vascolare dello strato tecale (*figura 23*).

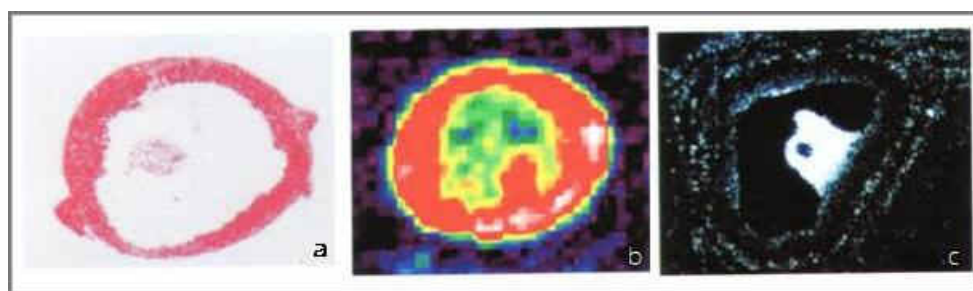


Figura 23. Follicolo ovarico preovulatorio. a: immagine istologica; b: diffusione del VEGF valutata mediante risonanza magnetica; c: espressione dell'RNAm del VEGF valutato mediante ibridazione in situ; l'espressione massima si osserva nelle cellule del cumulo ooforo che circondano l'oocita e all'interno delle cellule della granulosa più vicine all'antro (da Neeman et al., 1997).

La rete capillare follicolare sembra infatti strettamente associata a questo accumulo di VEGF nell'antro: è stato dimostrato che in follicoli porcini, a parità di dimensioni,

esiste una significativa correlazione positiva tra le concentrazioni intrafollicolari di VEGF e la densità vascolare della parete (Modlich et al., 1996).

Il “magazzinaggio” interno di VEGF potrebbe quindi rappresentare una strategia per creare un gradiente angiogenetico all’interno della stessa sede di produzione, impedendo nel contempo che follicoli adiacenti possano trarne vantaggio (Neulen et al., 1995).

Nei follicoli atresici, al contrario, sia le cellule della granulosa sia tecali sono VEGF-negative (Yamamoto et al., 1997).

L’importanza del VEGF nel sostenere la crescita follicolare è stata inoltre documentata in vivo, evidenziando notevoli influenze sullo sviluppo follicolare a seguito dell’inibizione del recettore VEGFR-2 (Wulff et al., 2002).

In particolare, il blocco dei recettori ovarici VEGFR-2 determinerebbe una riduzione del diametro dei follicoli all’inizio della fase antrale, inibizione dello sviluppo dei follicoli antrali, assenza di follicoli terziari, ed una significativa inibizione dell’espressione dei recettori VEGFR nelle cellule endoteliali della vascolarizzazione tecale. Inoltre, il blocco del legame recettoriale del VEGF sembrerebbe ridurre dell’80% la proliferazione delle cellule della teca, suggerendo un possibile ruolo del VEGF anche nella proliferazione di cellule non endoteliali (figura 24).

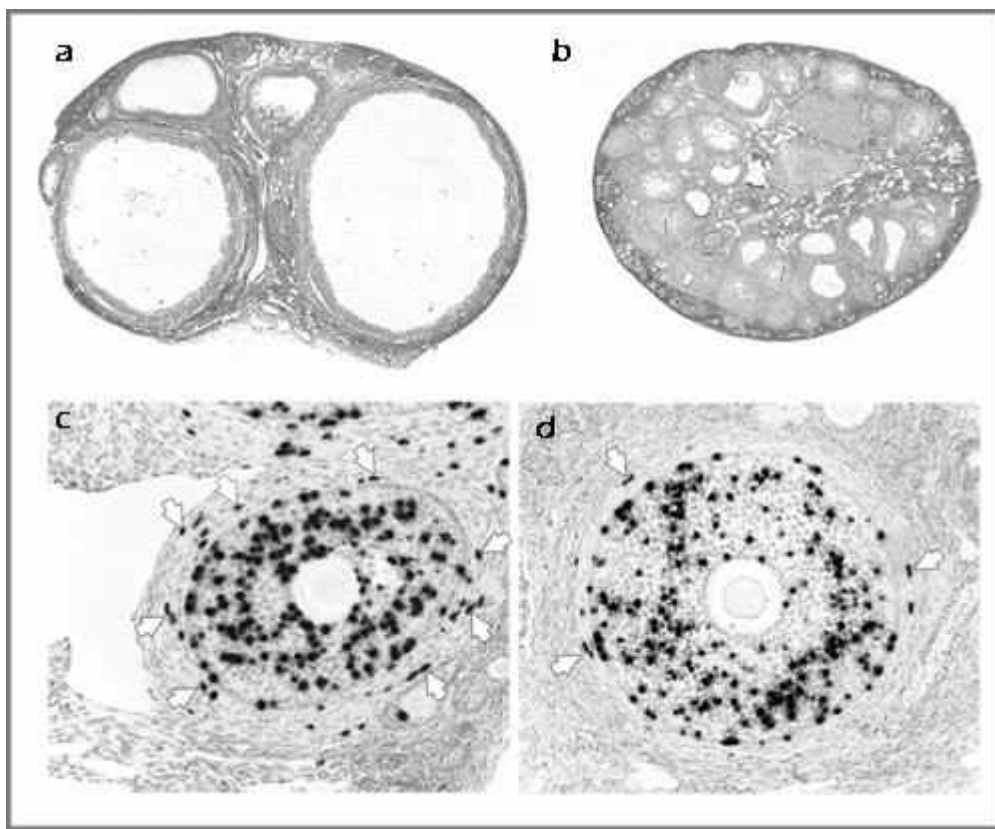


Figura 24. Effetto dell'inibizione del VEGFR-2 in follicoli preovulatori. Nell'ovaio di controllo (a) sono visibili due follicoli dominanti funzionali, mentre a seguito del trattamento è visibile l'inibizione della crescita follicolare (b). *Figura 24c,d.* Effetto dell'inibizione del VEGFR-2 sulla proliferazione delle cellule della granulosa in follicoli secondari. E' visibile la riduzione della proliferazione delle cellule (c) a seguito del trattamento (d) (da Wulff et al., 2002).

A questo proposito, i recettori del VEGF sono stati individuati anche in cellule della granulosa bovine (Greenaway et al., 2004), dove questo fattore svolgerebbe un ruolo citoprotettivo verso la caspasi-3: follicoli funzionali mostrano un tasso apoptotico delle cellule della granulosa esiguo in coincidenza di un'alta espressione di VEGFR-2, mentre nei follicoli atresici si evidenzia la situazione opposta.

L'inibizione in vivo del recettore VEGFR-2, ha inoltre consentito di investigare (Zimmermann et al., 2002) un possibile coinvolgimento del VEGF nella sintesi degli ormoni ipofisari e ovarici durante le specifiche fasi dello sviluppo follicolare.

In particolare, al blocco recettoriale nella fase iniziale dello sviluppo follicolare, consegue una soppressione della sintesi degli estrogeni e dell'inibina, in associazione ad un rapido aumento dei livelli sierici di LH e FSH.

L'inibizione recettoriale a metà della fase follicolare causa atresia dei follicoli più sviluppati, ed esita in un periodo di quiescenza ovarica fino al reclutamento di una nuova coorte follicolare.

Il blocco di VEGFR-2 nella fase preovulatoria inibisce l'aumento di steroidi ovarici e l'ovulazione (Zimmermann et al., 2001), pur verificandosi un rapido e deciso aumento di LH e FSH (Fraser et al., 2005).

Queste evidenze suffragano l'ipotesi di una correlazione diretta tra VEGF e gonadotropine, che appare coinvolta anche nel processo dell'ovulazione: oltre a stimolare la sintesi di alcuni enzimi proteolitici che intervengono nella deiscenza della parete follicolare, il VEGF parteciperebbe al rapido aumento della permeabilità vascolare che contraddistingue il momento dell'ovulazione. Questo evento sembra dipendere dall'interazione del VEGF con le prostaglandine, poichè dopo somministrazione di gonadotropine esogene, l'espressione di VEGF e delle prostaglandine aumenta parallelamente (Espey et al., 1994).

I meccanismi con cui il VEGF stimola la fuoriuscita di proteine plasmatiche ed altre macromolecole dai vasi non sono ancora del tutto chiari, ma si ritiene che, oltre a sfruttare i pori, le molecole entrino nelle cellule endoteliali mediante l'apertura di

stomi cellulari, attraversino le cellule contenute in vacuoli e vengano quindi eliminate mediante esocitosi (Dvorak et al., 1999).

A livello follicolare, un'adeguata produzione di VEGF sarebbe inoltre associata ad un corretto apporto trofico all'oocita durante il suo sviluppo, e quindi ad un maggior potenziale di impianto dopo la fecondazione (Van Blerkom et al., 1997).

Regolazione della produzione

La stretta associazione esistente tra sintesi di VEGF e diametro follicolare potrebbe dipendere dalla progressiva riduzione della tensione di ossigeno che viene a crearsi nel liquido follicolare. La produzione del VEGF e l'espressione del suo recettore VEGFR-2 (Claesson-Welsh, 2003) sono infatti strettamente regolate dalla tensione di ossigeno (pO_2), e nello specifico stimulate dall'ipossia.

A livello follicolare, in conseguenza all'impermeabilità della membrana basale, la proliferazione dello strato della granulosa esita in un allontanamento sempre maggiore dei vasi dall'antro, portando ad una condizione di crescente ipossia.

Tale presupposto è stato confermato sperimentalmente (Basini et al., 2004) dall'osservazione che la tensione di ossigeno nel liquido antrale di follicoli suini si riduce all'aumentare delle dimensioni follicolari, in accordo con quanto osservato nella specie umana, nella quale sono stati riportati valori di O_2 variabili dall'1,5% al 5,5% (Van Blerkom et al., 1997).

A seguito di questo stimolo ipossico, la produzione di VEGF sembrerebbe principalmente indotta dall'attivazione del fattore di trascrizione ipossico Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) (Wiesener et al., 1998).

In particolare, entrambe le regioni terminali 5' e 3' del gene del VEGF contengono una regione sensibile all'ipossia, definita HRE, che viene legata dall'HIF-1 (Forsythe et al., 1996), aumentandone l'espressione.

Nello specifico, l'HIF-1 è un eterodimero caratterizzato da due forme α e β (Semenza, 2000): l'HIF-1 β è espresso costitutivamente, mentre l'HIF-1 α viene stabilizzato e accumulato nel nucleo solo in condizioni di ipossia, dove induce la transattivazione di numerosi geni implicati nell'angiogenesi (Pagé et al., 2002) (figura 25).

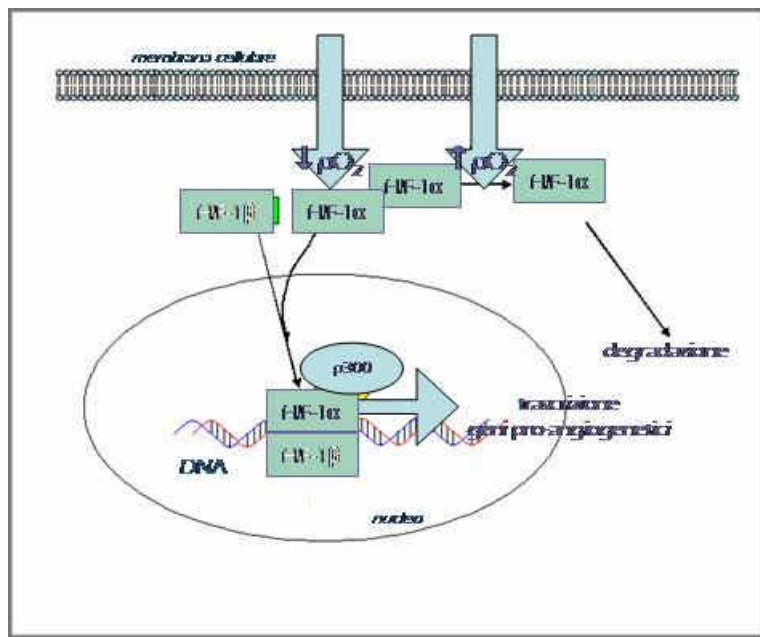


Figura 25. In condizioni di ipossia l'HIF-1 α viene stabilizzato e accumulato nel nucleo dove induce la transattivazione di numerosi geni implicati nell'angiogenesi.

E' stata documentata (Boonyaparakob et al., 2005) l'espressione di RNAm per l'HIF-1 α e la sua localizzazione fisiologica nell'ovaio in follicoli funzionali e nel corpo luteo. In particolare, l'espressione di HIF-1 α nel follicolo peovulatorio appare più

marcata nello strato della granulosa, che rappresenta la sede più direttamente esposta allo stimolo ipossico nell'ambiente follicolare (*figura 26*).

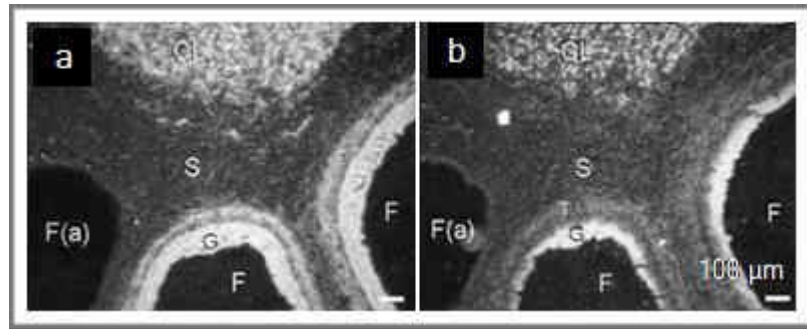


Figura 26. Sezione di ovaio porcino, ibridazione in situ per (HIF)-1 α (a) e VEGF (b).

L'espressione di HIF-1 α e di VEGF è predominante nel corpo luteo (CL) e nella membrana della granulosa; F — follicolo; F(a) — follicolo atresico; G — granulosa; S —stroma; T — teca (da Boonyaparakob et al., 2005).

L'espressione del VEGF indotta dall'ipossia è mediata anche da ormoni e fattori di crescita. Ad esempio, l'HIF-1 medierebbe la secrezione di VEGF in cellule della granulosa di follicoli preovulatori indotta dall'Insulin Growth Factor (IGF-1 e IGF-2) in sinergia con l'LH (Martinez-Chequer et al., 2003); il picco di LH stimola l'espressione ovarica di HIF-1 α durante il periodo preovulatorio e le prime fasi della luteinizzazione.

Inoltre, FSH e LH stimolano la proteina attivatrice (AP)-1 (Sharma et al., 2000), necessaria per la trascrizione completa del VEGF indotta dall'ipossia.

L'induzione ipossica dell'espressione di VEGF è anche mediata dall'adenosina tramite i recettori α_2 ; ciò determina l'incremento intracellulare di AMPc con

stimolazione dell'espressione del RNAm per il VEGF, probabilmente attraverso l'intervento di una proteina chinasi (De Ponti et al., 2007).

Recenti studi (Agarwal et al., 2006; Ushio-Fukai, 2006) suggeriscono inoltre un coinvolgimento delle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), prodotte principalmente dalle cellule della granulosa durante la steroidogenesi, nella trasduzione del segnale ipossico a livello endoteliale.

I ROS che derivano dalla NADPH ossidasi aumenterebbero infatti l'espressione di HIF-1 (Gorlach et al., 2003), e potrebbero quindi giocare un ruolo importante nella stimolazione del VEGF in risposta all'ipossia (figura 27).

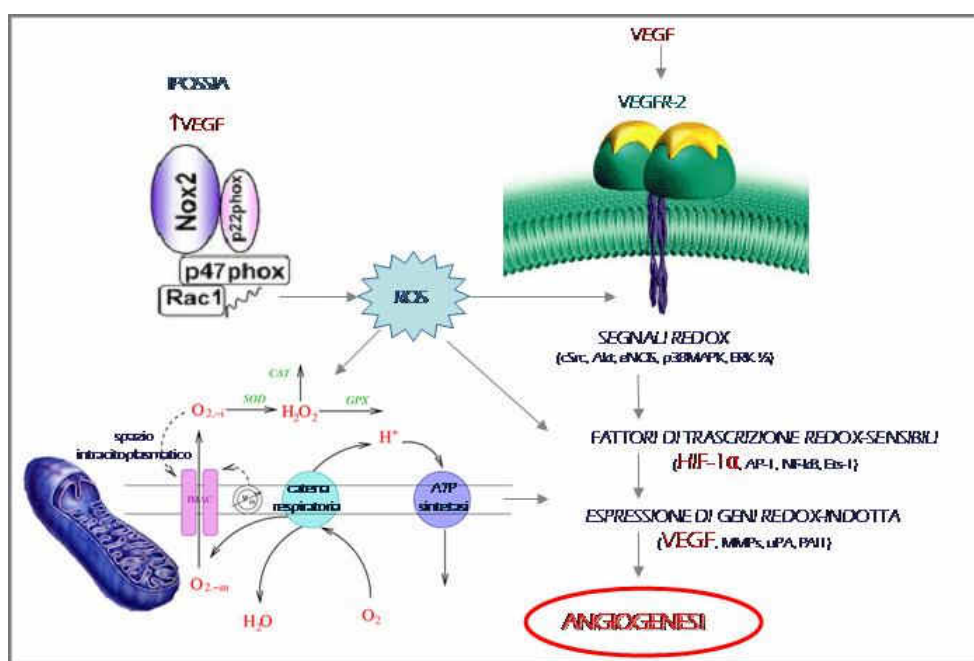


Figura 27. Possibile coinvolgimento dei ROS nella trasduzione del segnale ipossico.

L'anione superossido (O_2^-), ad esempio, interviene in diverse vie di trasduzione intracellulare coinvolte nell'induzione di geni correlati all'angiogenesi, quale ad esempio il VEGF (Ushio-Fukai, 2006).

Esistono inoltre evidenze sperimentali che la produzione di ROS nelle cellule endoteliali, conseguente all'attività della NADPH ossidasi, può mediare l'espressione delle metalloproteinasi -1 e -2 indotta dal VEGF (Wary et al., 2003).

Inoltre, lo stesso VEGF sembra in grado di indurre la produzione di basse concentrazioni di ROS in numerosi tipi cellulari, suffragando l'ipotesi che queste molecole agiscano da messaggeri intracellulari secondari (Xia et al., 2007).

Ad esempio, l'attivazione del VEGFR-2 stimola la produzione di ossido nitrico (NO) (Thuringer et al., 2002) che potrebbe essere considerato uno dei mediatori del VEGF. A sua volta, l'NO mostrerebbe effetti stimolatori sulla sintesi di VEGF a bassi dosaggi (Sandau et al., 2001), mentre svolgerebbe un'azione inibitoria ad alte concentrazioni; tale effetto ostacolerebbe probabilmente l'azione positiva dell'HIF-1 α (Kimura e Esumi, 2003).

1.5.3 Altri potenziali fattori angiogenetici ovarici

* L'Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor (EG-VEGF) è una proteina costituita da 86 amminoacidi, che possiede esclusività nei confronti dei tessuti steroidogenetici (LeCouter et al., 2001), che sono caratterizzati dalla presenza di cellule endoteliali con recettori specifici. Le sedi di produzione sono rappresentate dall'ovaio (stroma corticale, cumulo ooforo, cellule della granulosa e della teca), dall'utero, dalla placenta, e dal testicolo. In particolare, l'RNA per il EG-VEGF è stato evidenziato in follicoli bovini e umani (Ferrara et al., 2003; Kisliouk et al., 2005): nei follicoli primordiali e primari sembra localizzato principalmente a livello delle cellule della granulosa, mentre nei follicoli antrali sembra maggiormente espresso nelle cellule della teca. Analogamente al VEGF, l'EG-VEGF induce fenestrazione e regola la permeabilità endoteliale; anche la sua espressione sembra stimolata dall'ipossia mediante stabilizzazione dell'HIF-1 α ; l'esclusività per le strutture steroidogenetiche lo contraddistingue invece dal VEGF, che non mostra selettività sull'origine delle cellule endoteliali. Poiché EG-VEGF e VEGF in vitro esercitano effetti simili e additivi, e la localizzazione dell'espressione appare complementare nei comparti follicolari, è stato ipotizzato una possibile cooperazione in vivo nella regolazione dell'angiogenesi follicolare (LeCouter et al., 2001).

* Il basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), isolato per la prima volta in ipofisi bovine (Gospodarowicz et al., 1987), è un polipeptide di 155 amminoacidi appartenente ad una famiglia di 20 membri che comprende l'FGF-1 (Acid Fibroblast Growth Factor) e l'FGF-2 (Basic Fibroblast Growth Factor), che agiscono

tramite 4 recettori tirosin-chinasici ad alta affinità (FGFR). Nella scrofa, i livelli di RNAm per il bFGF a livello ovarico, sembrano maggiori nello strato della granulosa di follicoli grandi rispetto ai follicoli piccoli (Guthridge et al., 1992); nella bovina, la sua espressione nella teca interna aumenta notevolmente durante le fasi finali della maturazione follicolare. I recettori per l'FGF-1 sono infatti espressi dalle cellule endoteliali in tutti gli stadi di sviluppo follicolare ma particolarmente nelle fasi finali di questo processo. Il bFGF è coinvolto in due tappe fondamentali dell'angiogenesi follicolare, quali l'invasione della matrice extracellulare e la morfogenesi dei tubuli endoteliali attraverso una azione chemiotattica e mitogena che guida le cellule endoteliali nella migrazione (Nhels et al., 1998). A livello di follicoli preovulatori questo fattore esercita inoltre effetti mitogeni e antiapoptotici sulle cellule della granulosa che espongono siti di legame specifici indotti dall'FSH (Shikone et al., 1992).

* Le Angiopoietine (Angs) sono glicoproteine che controllano in maniera specifica la generazione di nuovi vasi sanguigni (Lewis et al., 2007). L'intervento delle Angs sembra particolarmente importante nella dinamica del rimodellamento vascolare del follicolo ovarico, poichè promuovono la stabilizzazione della rete vascolare in formazione e nel contempo destabilizzano la rete matura esistente. Nello specifico, l'Ang-1 attiva il recettore Tie-2 aumentando la stabilizzazione vascolare della rete in formazione, attraverso il reclutamento delle cellule mesenchimali periendoteliali di supporto (Teichert-Kuliszewska et al., 2001) e ottimizzandone l'integrazione con le cellule endoteliali (Maliba et al., 2008). In combinazione con il VEGF, l'Ang-1 è inoltre in grado di incrementare il diametro dei vasi, evitando nel contempo una eccessiva permeabilizzazione, poichè

favorisce la coesione dei vasi sanguigni (Thurston et al., 1999). Anche l'Ang-2 lega il Tie-2, ma agisce come un antagonista endogeno, bloccando la fosforilazione recettoriale (Maisonpierre et al., 1997). L'Ang-2 destabilizza infatti i vasi esistenti, allenta la matrice di supporto e permette ai fattori angiogenetici di stimolare la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali indotte ad acquisire uno stato più plastico. Nella bovina, le Angs sono espresse in entrambi gli strati parietali, mentre il recettore Tie-2, è espresso solo dalle cellule della teca (Hayashi et al., 2003). L'espressione dell'Ang-1 nello strato tecale non varia durante lo sviluppo follicolare; l'espressione di RNAm per Ang-2 si riduce nei follicoli maturi, mentre aumenta drasticamente la luteolisi, suffragando una sua funzione nella regressione vascolare (Goede et al., 1998). Poichè l'Ang-2 blocca l'azione dell'Ang-1 a livello del loro comune recettore il corretto bilancio tra rapporto Ang-1:Ang-2 ed espressione del VEGF è essenziale per mantenere l'integrità del follicolo preovulatorio (Xu et al., 2005).

* L'Epidermal Growth Factor (EGF) è presente a livello follicolare nelle cellule della granulosa, della teca, nel cumulo ooforo e nelle cellule interstiziali (Wu e Tian, 2007). In questi distretti, inducendo la proliferazione delle cellule endoteliali, il fattore guida la formazione dei capillari che circondano il follicolo in accrescimento.

* L'Insulin-like Growth Factor 2 (IGF-2) è un potenziale regolatore autocrino della proliferazione e differenziazione cellulare nei processi angiogenetici luteinici; la sua presenza è stata evidenziata nei fibroblasti e nei periciti perivascolari di follicoli preovulatori (Schams et al., 2002) e di corpi lutei bovini (Schams et al., 1999).

* Il possibile coinvolgimento delle citochine nella regolazione della genesi vascolare ovarica è suffragato dal loro isolamento intraovarico (Gaetje, 1994). Le citochine proinfiammatorie possono svolgere infatti un ruolo rilevante nella fisiologia dell'ovulazione, fenomeno che condivide alcune caratteristiche con un processo infiammatorio acuto. L'interleuchina 8 (IL-8), potrebbe avere un ruolo anche nel periodo post-ovulatorio nella neovascolarizzazione del corpo luteo in formazione (Arci et al., 1996).

* Anche il Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) sembra possedere attività angiogenetica ed interviene nella regolazione della funzione del corpo luteo durante il ciclo estrale (Sakumoto et al., 2000).

* Il Trasforming Growth Factor - β 1 (TGF- β 1), analogamente al TNF- α , svolgerebbe un'azione indiretta sull'angiogenesi stimolando l'espressione di TNF- α , FGF-2, PDGF e VEGF, VEGFR (Antonelli-Orlidge et al., 1998). Inoltre, attivato dal contatto tra le cellule endoteliali e mesenchimali, induce differenziazione di queste ultime in periciti e cellule muscolari lisce, inibisce la proliferazione delle cellule endoteliali e stimola la deposizione di matrice.

* Altre citochine e loro recettori di localizzazione ovarica, quali l'Interferone, il Nerve Growth Factor (NGF), l'Angiogenina e il Platelet Derived Growth Factor (PDGF), sono in grado di influenzare l'angiogenesi attraverso il reclutamento di cellule mesenchimali o infiammatorie (Zhou et al., 1998).

* L'u-PA (urokinase-type Plasminogen Activator) e il t-PA (tissue-type Plasminogen Activator) sono proteasi che convertono il plasminogeno in plasmina: il t-PA regola l'attività fibrinolitica nel sangue, mentre l'u-PA modula l'attivazione del plasminogeno tissutale in plasmina (Binder et al., 2007). L'aggregazione del

fibrinogeno extravasato in fibrina fornisce una matrice provvisoria che sostiene la migrazione delle cellule endoteliali. La plasmina è invece responsabile della degradazione attiva di diversi componenti della matrice extracellulare quali fibrina, fibrinonectina, laminina, proteine core di proteoglicani; svolge inoltre un'azione indiretta tramite attivazione delle metalloproteinasi MMP-1, MMP-3 e MMP-9 (Rundhaug et al., 2005).

* La famiglia enzimatica delle Metalloproteinasi di matrice (MMPs) comprende 25 membri di molecole solubili che presentano un pre-dominio (un peptide segnale per la secrezione), un pro-dominio (rimosso a seguito dell'attivazione proteolitica), un dominio catalitico (contenente uno ione Zn) e un dominio contenente un sito di legame per gli inibitori specifici (Bogaczewicz et al., 2006). Le MMPs sono secrete come zimogeni e attivate proteoliticamente nella matrice extracellulare; la loro secrezione avviene in associazione a quella dei loro inibitori, che proteggono la struttura tissutale attraverso un controllo rigoroso dell'attività proteolitica locale (Binder et al., 2007) .

* Il Connective Tissue Growth Factor (CTGF), una proteina appartenente alla famiglia delle cisteine, è implicato quale regolatore paracrino della proliferazione cellulare e nel rimodellamento della matrice extracellulare. La presenza dell'RNA per il CTGF è stata documentata sia nella teca sia nella granulosa di follicoli porcini (Wandji et al., 2000) e murini (Harlow e Hillier, 2002). L'espressione sembra assente nei follicoli preantrali piccoli, mentre raggiunge livelli massimi nella granulosa di follicoli antrali medi, diminuendo poi nei follicoli preovulatori; sarebbe inoltre espresso nelle cellule endoteliali e nei fibroblasti del corpo luteo (Duncan et al., 2005).

* Evidenze sperimentali attribuiscono alle molecole di adesione un ruolo nel controllo endocrino e paracrino della permeabilità vascolare del follicolo, anche attraverso possibili interferenze del VEGF. E' stato infatti ipotizzato che il VEGF possa indurre fenestrazione vascolare anche alternando il complesso delle proteine di adesione cellula-cellula delle giunzioni endoteliali aderenti e occludenti (Wulff et al., 2004). Le cellule endoteliali esprimono infatti specifiche proteine di adesione transmembrinarie come le VE-caderine nelle giunzioni aderenti e le claudine nelle giunzioni occludenti (Dejana, 2004), queste molecole mediano interazioni omofiliche calcio-dipendenti tra cellule endoteliali (Vestweber et al., 2008). Il ruolo critico delle VE-caderine nell'angiogenesi follicolare sarebbe testimoniata dall'osservazione sperimentale che una loro inibizione in vivo inibisce la neovascolarizzazione indotta dalle gonadotropine (Nakhuda et al., 2005). E' stato dimostrato (Gruemmer et al., 2005) che il trattamento con fluido follicolare in cellule endoteliali regolerebbe la loro trascrizione di geni angiogenetici, quali ad esempio le E-selectine; queste molecole in vitro inducono la migrazione di cellule endoteliali e la formazione di vasi, mentre in vivo stimolano l'angiogenesi (Yukami et al., 2007). Nel fluido follicolare umano (Benifla et al., 2001) è presente la proteina VCAM-1, che induce stimoli chemiotattici nelle cellule endoteliali in vitro e angiogenesi in vivo (Yang et al., 2005). Tra i marker di adesione cellulare endoteliale il più comunemente usato è il PECAM/CD31, isolato dall'endotelio di follicoli murini e di primati (Christenson e Stouffer, 1996). Infine le integrine sono di particolare importanza poichè sono dei recettori per numerose proteine angiogenetiche (Luscinskas e Lawler, 1994). Ad esempio, anticorpi diretti contro

l'integrina $\alpha\beta3$ bloccano specificamente l'angiogenesi indotta da FGF-2 e TNF α ;
antagonisti dell'integrina $\alpha\beta5$ inibiscono l'azione del VEGF.

1.5.4 Poteniali fattori anti-angiogenetici ovarici

* L'angiostatina è un frammento proteolitico (peptide 45-kDa) del plasminogeno che possiede proprietà antiangiogenetiche (Corneluis et al., 1998). La plasmina, derivante dall'attivazione del plasminogeno, subisce clivaggio ad opera di una chinasi fosfoglicerata, la successiva proteolisi mediata dalle MMP genera l'angiostatina (Lijnen et al., 1998). Numerose molecole, quali l' $\alpha v \beta 3$ integrina (Tarui et al., 2001) e l'angiomotina, sono state proposte come bersaglio d'azione dell'angiostatina (Geiger e Cnudde 2000). Inoltre l'angiostatina agisce direttamente sull'ATP sintetasi della superficie endoteliale, causando una caduta del pH intracellulare e quindi eventi apoptotici nelle cellule endoteliali (Moser et al., 1999). Questa molecola svolge un ruolo importante nell'angiogenesi luteinica influenzando negativamente lo sviluppo del corpo luteo (O'Reilly et al., 1994).

* L'antitrombina è una molecola anticoagulante che appartiene agli inibitori delle proteasi, per la quale sono recentemente emersi anche possibili effetti inibitori sull'angiogenesi (Roemisch et al., 2002), il meccanismo d'azione ipotizzato è l'inibizione dell'espressione del percolano, un fattore proangiogenetico delle cellule endoteliali (Zhang et al., 2004).

* L'Arrestina è un frammento 26-kDa di un dominio (NC1) del collagene tipo IV, identificato nella parete del follicolo porcino (Mukherjee et al., 1999). L'arrestina può bloccare il legame tra l' $\alpha 1 \beta 1$ integrina e il collagene tipo I (Pozzi et al., 1998) e inibire il recettore HSPG (Colorado et al., 2000) che è coinvolto nel segnale dei fattori di crescita (Karumanchi et al., 2001).

* L'endostatina, un frammento 20-kDa C-terminale del collagene XVIII, è un potente inibitore dell'angiogenesi e nello specifico della migrazione endoteliale attraverso un'interazione con la $\alpha 5\beta 1$ integrina (Sudhakara et al., 2003). Altre evidenze suggeriscono che l'endostatina blocca il proangiogenetico HSPG. Alcuni effetti dell'endostatina dipendono anche dall'interazione con l'arginina (Kreuger et al., 2002), le angiopoietine (Yu et al., 2006) la $\beta 1$ integrina, inibendo nell'insieme varie azioni specifiche sulle cellule endoteliali (Wickstrom et al., 2004).

* La 16-kDa prolattina deriva dal clivaggio proteolitico della 23K-prolattina (Ferrara et al., 1991), una molecola che esplica le sue capacità proangiogenetiche mediante induzione del VEGF (Goldhar et al., 2005). Al contrario, il 16K-PRL ha effetti antiangiogenetici bloccando i segnali del VEGF e del bFGF nelle cellule endoteliali (D'Angelo et al., 1999). Il bilancio tra gli effetti positivi e negativi delle due molecole prolattiniche potrebbe offrire un meccanismo di controllo angiogenetico in molti tessuti, compreso quello ovarico (Struman et al., 1999)

* Interferone $\alpha/\beta/\gamma$ regolano la risposta immunitaria, riconosciuti tra i primi inibitori endogeni dell'angiogenesi (Sidiky e Borden 1987); tale effetto appare in parte mediato dalla loro azione inibitoria sull'espressione di numerosi fattori proangiogenetici quali bFGF (Slaton et al., 1999), VEGF (von Marshall et al., 2003), e MMP-9 (Slaton et al., 2001).

* Il Tumor Necrosis Factor alfa (TNF) esplica numerose azioni sul corpo luteo ed in particolare nell'angioregressione, esercitando un effetto citotossico sulle cellule endoteliali. Sia le cellule steroidogeniche sia quelle endoteliali possiedono recettori per il TNF. La stimolazione con TNF induce apoptosi in cellule endoteliali

del corpo luteo di bovina in assenza di una adeguata stimolazione progestinica (Friedman et al., 2000).

* Tra gli inibitori delle proteasi seriniche, la Maspina è un inibitore naturale del sistema dell'attivatore del plasminogeno uPA/uPA recettore (Biliran e Sheng, 2001).

* Il Pigmet Epithelium-Derived Factor (PEDF) è una proteina appartenente alla superfamiglia delle serpine che sembra esercitare effetti antiangiogenetici attraverso l'inibizione della crescita dello stroma vascolare (Doll et al., 2003). In particolare, le sue proprietà antiangiogenetiche dipendono dall'interferenza con molteplici vie di trasduzione quali: Akt/NFkB, MAPK e caspasi. Nello specifico, l'effetto antiangiogenetico, sembra dipendere dall'induzione del ligando Fas (FasL), cui consegue apoptosi endoteliale (Volpret et al., 2002).

* La forma solubile del recettore VEGF 1, il sVEGFR-1, lega il VEGF ma non ne trasduce il segnale poiché privo del dominio intracellulare tirosinchinasico (Yamaguchi et al., 2002). sVEGFR1 agirebbe quindi come un recettore di richiamo, sequestrando il ligando e bloccando perciò l'attivazione del VEGFR, dal quale dipende il principale segnale angiogenetico del VEGF.

* Le trombospondine (TSP-1 e -2) sono glicoproteine della matrice extracellulare che esercitano effetti anti-angiogenetici ed inibiscono la migrazione endoteliale. Nell'ovaio di ratto, l'espressione della TSP-1 e del recettore di superficie CD36 è elevata nelle cellule della granulosa di follicoli preantrali ed antrali (Petrik et al., 2002). Nella bovina, l'espressione della TSP-1 e del CD36 è maggiore nelle cellule della granulosa di follicoli piccoli, poi decresce e scompare nei follicoli grandi (Greenaway et al., 2005). Questo pattern di sintesi suggerisce un possibile

coinvolgimento di queste sostanze nella soppressione dello sviluppo vascolare durante gli stadi iniziali dello sviluppo follicolare, contribuendo a restringere la crescita follicolare fino a quando non si mette in funzione quella serie sincronizzata di eventi implicati nella sintesi di VEGF e dei suoi recettori. Infatti l'espressione delle TSP diminuisce parallelamente all'aumento dei livelli di VEGF.

* Come precedentemente riportato, l'Ang2 antagonizza l'effetto dell'Ang-1 ed è stata classificata quale inibitore endogeno del sistema Ang-1/Tie2 (Asahara et al., 1998). La somministrazione diretta di Ang2 in follicoli preovulatori di primati blocca l'ovulazione (Xu et al., 2005), mentre lo stesso dosaggio di Ang1 non sembra avere effetti. E' stato inoltre evidenziato un marcato aumento dell'RNA per l'Ang2, associato ad una riduzione dell'espressione di VEGF, nelle cellule della granulosa di follicoli atresici (Maisonpierre et al., 1997).

* Gli inibitori tissutali delle MMP (TIMPs) sopprimono l'attività delle MMP, oltre ad esercitare molti effetti sulla crescita cellulare, apoptosi e differenziazione (Brew et al., 2000). All'interno della famiglia dei TIMP, il TIMP2 mostra un'attività antiangiogenetica indipendente dall'inibizione delle MMP. E' stato rilevato che le gonadotropine stimolano la sintesi di questo polipeptide sia da parte delle cellule della granulosa di follicoli preovulatori ovini sia del corpo luteo (Smith et al., 1993). L'effetto sembra mediato dalla $\alpha 3\beta 1$ integrina che lega il TIMP2 a livello delle cellule endoteliali. Inoltre, il TIMP2 indurrebbe una diminuzione dell'attività della fosfatasi tirosinica, associata alla subunità della $\beta 1$ integrina (Stetler-Stevenson e Seo, 2005).

1.5.5 Estrogeni, progesterone e angiogenesi ovarica

Sebbene il ruolo degli ormoni nella fisiologia ovarica sia ben conosciuto, i loro effetti specifici sulla microvascolarizzazione locale non sono ancora completamente noti (*figura 28*).

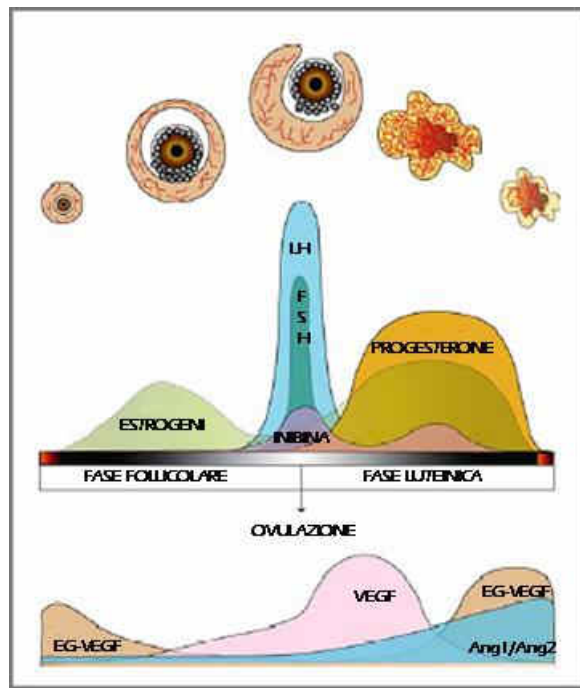


Figura 28. Profilo ormonale, fattori angiogenetici e risposta angiogenetica ovarica durante il ciclo estrale (da Ramakrishnan et al., 2005).

Tra le potenziali sostanze ormonali modulatrici, gli estrogeni sono stati molto studiati per la loro capacità di indurre l'angiogenesi in vivo in condizioni sia fisiologiche sia patologiche (Hyder e Stancel, 1999).

Le cellule endoteliali esprimono i recettori per gli estrogeni, la cui attività proangiogenetica sarebbe associata non solo ad i loro effetti epiteliotropici ma

anche ad un'azione indiretta tramite una modulazione dell'espressione di citochine angiogenetiche in altri tipi di cellule.

A livello endoteliale, l'estradiolo-17 β induce la proliferazione, la differenziazione e la migrazione delle cellule endoteliali, promuove la formazione di capillari in vitro, il reclutamento delle cellule muscolari lisce della tonaca media dei vasi (Knobil, 1988), e stimola la produzione di fattori di crescita.

Nell'ambiente follicolare, è stata documentata l'esistenza di una correlazione positiva tra i livelli intrafollicolari di VEGF e di estradiolo-17 β (Modlich et al., 1996).

L'espressione di VEGF in vitro in cellule endometriali, sembra aumentare dell'85% dopo una breve stimolazione estrogenica (Shifren et al., 1996); anche il progesterone sembrerebbe aumentare l'espressione di VEGF in cellule endometriali umane (Cullinan-Bove e Koos, 1993). Queste evidenze sperimentali documenterebbero che il VEGF rappresenta uno dei primi geni coinvolti nella trascrizione indotta dalla stimolazione steroidea, come suggerito anche da altri autori (Weisz e Bresciani, 1988; Jouvenot et al., 1990).

Risultati analoghi sono stati evidenziati (Charnock-Jones et al., 1993) anche in linee cellulari endoteliali, nelle quali l'E2 sembra aumentare in misura dose-dipendente i livelli di RNAm per il VEGF. Inoltre, è stato osservato che sostanze ad attività anti-estrogenica inibiscono la proliferazione endoteliale stimolata da FGF-2 e VEGF (Hyder e Stancel, 1999).

Anche in vivo è stato documentato (Cullinan-Bove e Koos, 1993) un rapido aumento della sintesi di VEGF dopo somministrazione di E2.

A livello di cellule endoteliali, inoltre, l'estradiolo e il progesterone, modulano direttamente l'espressione della E-selectina, una glicoproteina di membrana specifica che partecipa ai meccanismi angiogenetici (Aziz e Wakefield, 1996).

A livello follicolare, studi in vitro (Ford e Howard, 1997; Alak et al., 1998) hanno dimostrato che l'inibizione della produzione di estradiolo e di progesterone riduce la crescita delle cellule endoteliali capillari.

Studi in vitro evidenziano invece che i metaboliti progestinici 17-alfa-idrossiprogesterone e medrossiprogesterone acetato determinano degenerazione della microvascolarizzazione (Zhu et al., 1999).

Anche le gonadotropine sarebbero implicate nell'angiogenesi poichè stimolerebbero l'espressione di VEGF nel follicolo (Barboni et al., 2000)

L'LH indurrebbe la produzione di VEGF da parte delle cellule della granulosa di follicoli pre e periovulatori di primati (Garrido et al., 1993); nelle cellule della teca di follicoli di bovina stimola la liberazione dell'Endotelina-1 (ET-1), che a livello ovarico è coinvolta nella proliferazione e nella vitalità delle cellule endoteliali (Otani et al., 1996).

IL 2-METOSSIESTRADIOLO

2.1 Biosintesi e metabolizzazione

La metabolizzazione degli estrogeni primari, estradiolo (E₂) ed estrone, esita nella formazione sequenziale di molecole caratterizzate da gradi diversi di attività estrogenica, nel loro insieme definite catecolestrogeni (Fishman, 1983) (*figura 29*).

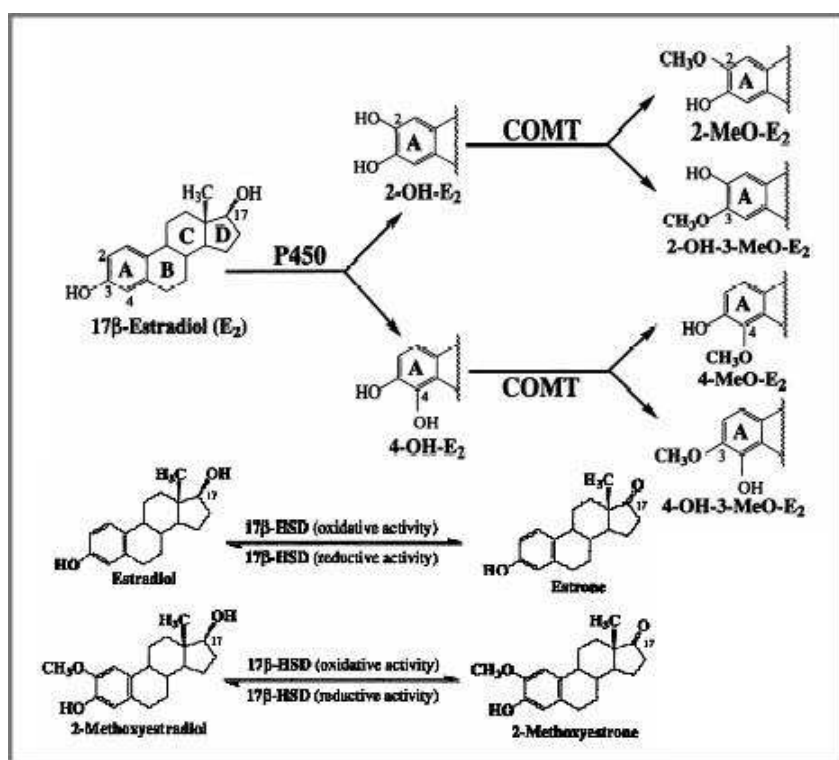


Figura 29. Biosintesi dei catecolestrogeni.

Nello specifico, attraverso la via della citocromo P450 (Tsuchiya et al., 2005), gli estrogeni subiscono idrossilazione dell'anello aromatico A in posizione C2 e C4, ad opera delle estrogeno-2 (E-2-H) e 4 (E-4-H)-idrossilasi che portano rispettivamente alla sintesi di 2-idrossiestradiolo (2-OH-E2) e di 4-idrossiestradiolo (4-OH-E2) (Ball e Knuppen, 1980).

Queste molecole idrossiliche vengono successivamente metilate, grazie all'azione dell'enzima catecol-O-metil-transferasi (COMT) che consente la formazione di 2-metossiestradiolo (2-ME) e 4-metossiestradiolo (4-ME).

La successiva metabolizzazione dei metossiestrogeni richiede l'idrossilazione e la deidrogenazione, con produzione di 2-metossiestrone e 4-metossiestrone, i metaboliti inattivi; in alternativa, questi composti possono essere demetilati, riacquistando l'attività dei catecolestrogeni d'origine (Ball et al., 1983).

2.2 Effetti biologici

Pur possedendo una stabilità maggiore del suo precursore 2-OH-E2 (Zacharia et al., 2004), il 2-ME è estremamente labile (Spicer et al., 1987); come conseguenza, la sua breve emivita in circolo potrebbe precluderne un importante ruolo sistemico.

È pertanto plausibile che gli effetti biologici di questo metabolita siano imputabili alla sua formazione diretta nel sito d'azione.

Le maggiori concentrazioni di 2-ME sono state infatti evidenziate in tessuti ed organi sede di sintesi e metabolizzazione, quali l'ovaio (Shang et al., 2001), che è caratterizzato da un'alta concentrazione di substrato estrogenico.

Sia nelle specie umana sia in quella equina, il 2-ME sarebbe il catecolestrogeno presente in maggior quantità nel fluido antrale di follicoli funzionali, mentre i suoi livelli risulterebbero molto inferiori nei follicoli atresici (Silberzan et al., 1985)

Le cellule della granulosa di follicoli porcini preovulatori, sono state identificate quale sede di maggior attività biosintetica sia della idrossilasi E-2-H, sia della COMT, presente in entrambe le forme (solubile e di membrana) (Salih et al., 2007)

L'espressione della COMT è stimolata da elevati livelli di androgeni, estrogeni, e dalle citochine infiammatorie (Wentz et al., 2006); nel follicolo preovulatorio l'attività della E-2-H è 10-100 volte maggiore rispetto ai follicoli antrali piccoli e al corpo luteo (Hammond et al., 1986), raggiunge la sua massima attività prima del picco di LH, parallelamente all'aumento di E2 e diminuisce quando inizia la luteinizzazione.

Questo controllo coordinato dell'enzima e del suo substrato è stato documentato anche nel tessuto epatico, nel quale la somministrazione in vitro di estrogeni ha stimolato l'attività enzimatica (Shiverick e Notelovitz, 1983).

Al contrario, il 2-ME sembrerebbe esercitare un effetto negativo dose dipendente sulle idrossilasi, regolando di conseguenza il metabolismo dell'estradiolo (Dawling et al., 2003).

La modulazione dell'attività della COMT, e quindi della produzione di 2-ME, potrebbe interferire nella funzionalità ovarica, poichè alterazioni patologiche della sua attività enzimatica sono associate ad inibizione della steroidogenesi, induzione del processo di atresia follicolare e arresto dell'ovulazione (Salih et al., 2006).

Recentemente Salih et al. (2007) ha documentato gli effetti sia del 2-ME sia di inibitori specifici della COMT sulla proliferazione e produzione basale di steroidi in colture di cellule della granulosa porcine JC410: in particolare, a bassi dosaggi il 2-ME ha esercitato effetti stimolatori sulla proliferazione e sulla sintesi steroidea, mentre a concentrazioni maggiori ha dimostrato un'azione opposta; l'inibizione specifica della COMT ha invece determinato un effetto stimolatorio dose-dipendente su entrambi i parametri considerati.

Questi dati suffragano lavori precedenti, nei quali il 2-OH-E2 si è dimostrato un induttore efficace della sintesi progestinica in colture di cellule della granulosa sia suine (Spicer e Hammond, 1987a; Spicer e Hammond, 1987b) sia murine (Hudson e Hillier, 1985; Hudson et al., 1987), amplificando significativamente i livelli di AMPc indotti dall'FSH (Spicer e Hammond, 1989). Inoltre, il 2-ME sembrerebbe inibire la proliferazione basale di cellule della granulosa bovine (Fotsis et al., 1994).

In merito all'azione bifasica evidenziata da Salih et al. (2007) è verosimile che l'effetto stimolatorio di questo metabolita sia conseguente ad una debole stimolazione dei recettori estrogenici, per i quali il 2-ME possiede una debole affinità a basse concentrazioni (Zhu et al., 1998).

Diversi autori (LaVallee et al. 2002; Mooberry et al. 2003; Dubey et al. 2004) hanno infatti evidenziato che i catecolestrogeni agirebbero prevalentemente secondo vie indipendenti dagli estrogeni primari, che di fatto non condividono l'attività citotossica e antiproliferativa del 2-ME.

In proposito, Shang et al (2001) ha comparato gli effetti in vitro del 2-ME e dell'E2 su cellule endoteliali e cellule della granulosa suine, stimulate rispettivamente con il fattore di crescita EGF e con EGF o FSH. Il trattamento con 2-ME ha determinato una significativa riduzione della capacità proliferativa delle cellule endoteliali; nelle cellule della granulosa la proliferazione è risultata parzialmente inibita solo nelle colture trattate con EGF, mentre in presenza di FSH il 2-ME si è dimostrato inefficace. Diversamente, l'E2 non ha compromesso la capacità proliferativa in nessuno dei due tipi cellulari.

I dati emersi in questo studio consentono di ipotizzare che, nel microambiente follicolare, il 2-ME potrebbe partecipare all'attenuazione della mitosi o alla promozione dell'apoptosi nelle cellule della granulosa, qualora divengano insufficienti i livelli di FSH o dei fattori di crescita, suggerendo nel contempo un suo possibile ruolo nel controllo della vascolarizzazione ovarica.

Studi in vitro (Stromblad et al., 1996; Shang et al., 2001), evidenziano che il 2-ME infatti svolgerebbe effetti antiangiogenetici che si esplicherebbero attraverso l'induzione selettiva di meccanismi apoptotici nelle cellule endoteliali.

L'induzione apoptotica si svolgerebbe mediante meccanismi cellulari specifici, interagendo ad esempio con enzimi superossidodismutasi (SOD), attraverso un possibile effetto diretto a livello mitocondriale (Huang et al., 2000), e ossido nitrico sintetasi, mediante la via della p53 che indurrebbe un aumento della produzione di ossido nitrico all'interno della membrana plasmatica, evento associato con la senescenza e l'apoptosi cellulare (Tsukamoto et al., 1998).

In cellule endoteliali di arteria polmonare bovina (BPAEC) il 2-ME ha causato modificazioni morfologiche caratteristiche di eventi apoptotici (Yue et al., 1997), quali assottigliamento cellulare, comparsa di vescicole intracitoplasmatiche, condensazione citoplasmatica e nucleare, verosimilmente stimolando l'espressione di FAS e Bcl-2 (Newman et al., 2004) (*figura 30*).

In diversi tipi cellulari inoltre, il trattamento con 2-ME ha arrestato il ciclo cellulare in fase G1, conseguente ad una inibizione della sintesi di DNA, e in fase G2/M a seguito di una azione sui microtubuli cellulari (Perez-Stable 2006).

Il 2-ME sembrerebbe agire sulle cellule endoteliali anche interferendo con la loro capacità di migrare. In proposito sono stati valutati i suoi effetti sulla vitronectina, una proteina di matrice nota per indurre adesione e migrazione endoteliale la cui azione è stata inibita sia in cellule endoteliali BPAEC, sia in CAM stimolata con bFGF (Yue et al., 1997) (*figura 31*).

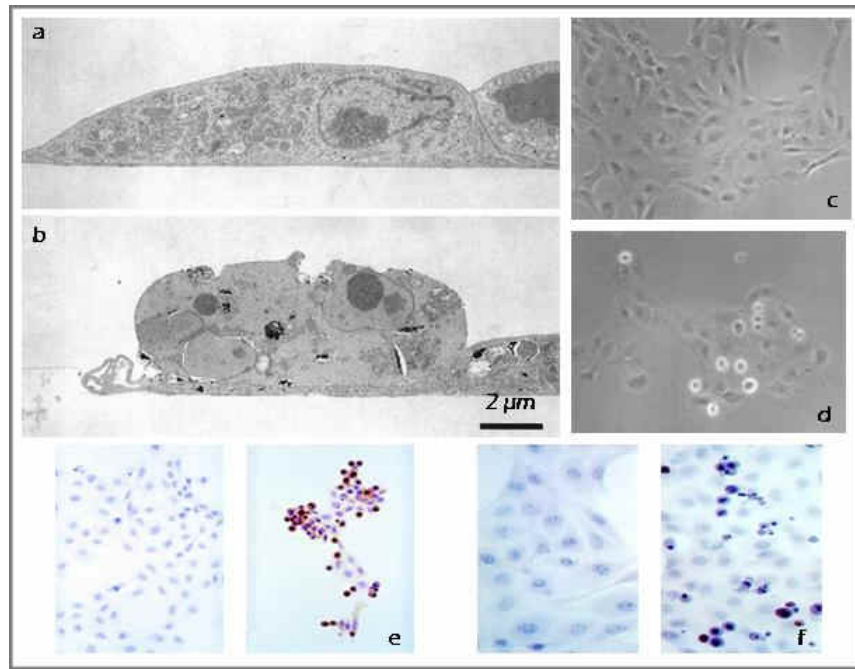


Figura 30. Il 2-ME (2 μ M) induce apoptosi in cellule endoteliali BPAEC. Caratteristiche ultrastrutturali di apoptosi, a: condensazione nucleare, b: frammentazione del DNA; d: immagine al microscopio a fluorescenza, frammentazione del DNA; localizzazione immunoistochimica delle proteine Fas (e) e Bcl-2 (f) (da Yue et al., 1997).

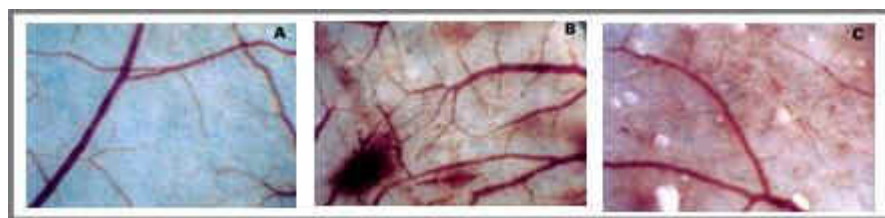


Figura 31. Il 2-ME (2 μ M) inibisce l'angiogenesi indotta da bFGF (1 μ g/ml) in CAM.

A, controllo. B, bFGF. C, bFGF con 2-ME (da Yue et al., 1997).

In corso di angiogenesi neoplastica, è stato inoltre evidenziato (Banerjee et al., 2003) un effetto bifasico dose-dipendente del 2-ME sulla produzione di VEGF, che risulta significativamente inibita dai maggiori dosaggi utilizzati.

In lavori recenti, e' stata documentata l'azione inibitoria in vivo del 2-ME (Becker et al., 2008) sulla permeabilità vasale stimolata dal VEGF e sull'attività trascrizionale dell'HIF-1 α .

Precedenti studi in vitro (Mabjeesh et al., 2003; Ricker et al., 2004), hanno evidenziato che il 2-ME agirebbe in modo specifico sull'HIF-1 α , senza coinvolgere il dimero β , riducendone la sintesi e aumentandone la degradazione (figura 32).

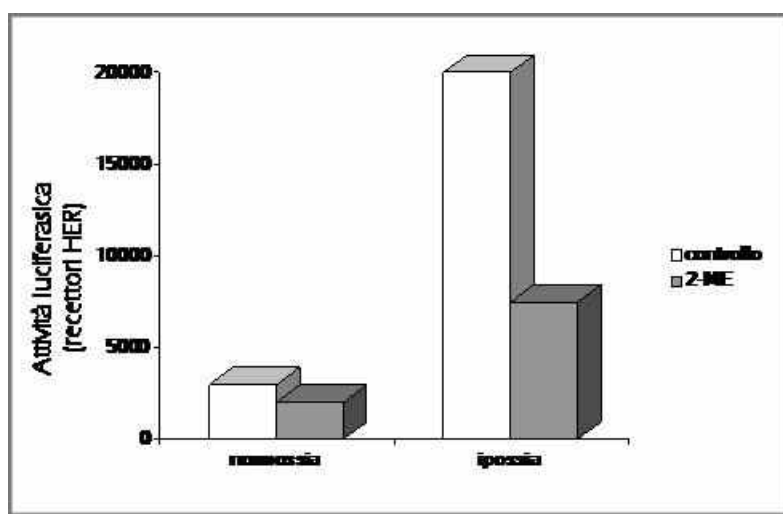


Figura 32. Il 2ME inibisce l'accumulo intracellulare di HIF-1 α in cellule endoteliali trattate con 2-ME e sottoposte ad ipossia (da Mabjeesh et al., 2003).

La diminuzione dell'accumulo intracellulare di HIF-1 α inibirebbe conseguentemente l'espressione di fattori proangiogenetici, quali il VEGF, la proteina di trasporto del glucosio Glut-1 e l'Endotelina-1.

Nel loro insieme, questi dati sperimentali documenterebbero il potenziale antiangiogenetico del 2-ME, che sembra coinvolgere sia azioni dirette sulle cellule endoteliali sia interferenze con molecole promotrici di neovascolarizzazione.

Le dinamiche che sottendono il verificarsi di questi eventi, soprattutto in vivo, sono però ad oggi ancora poco conosciute.

3

SCOPI

Numerose evidenze recenti identificano il 2-metossiestradiolo (2-ME), un metabolita dell'estradiolo, quale potente inibitore della crescita tumorale, attribuendo tale capacità alle sue proprietà antiangiogenetiche.

A livello ovarico, il fluido follicolare è una potenziale fonte di 2 ME: è pertanto plausibile ipotizzare un ruolo di questo metabolita nella regolazione fisiologica della neovascolarizzazione follicolare. Poiché l'angiogenesi rappresenta un evento imprescindibile durante la maturazione follicolare, la comprensione delle dinamiche che sottendono al suo controllo fisiologico acquista una rilevanza funzionale notevole.

Date tali premesse, il primo obiettivo di questo studio è stato quello di quantificare le concentrazioni di 2-ME nel fluido di follicoli antrali suini a diverso grado di sviluppo, al fine di individuare eventuali variazioni di questo metabolita durante la crescita follicolare.

Successivamente è stato investigato il possibile ruolo della sostanza quale regolatore fisiologico dell'angiogenesi follicolare.

Si è pertanto proceduto a trattare cellule della granulosa in coltura con 2-ME, al fine di evidenziare possibili variazioni nella produzione di VEGF.

Durante la crescita follicolare, la progressiva condizione ipossica dell'antro rappresenta il principale stimolo angiogenetico per la produzione di VEGF da parte delle cellule della granulosa.

Poiché è stato dimostrato (Basini et al., 2004a; Basini et al., 2004b; Grasselli et al., 2005) un ruolo chiave delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nella trasduzione del segnale ipossico, sono inoltre stati valutati gli effetti del 2-ME sul rilascio dell'anione superossido (O_2^-) e sull'attività del suo enzima di detossificazione superossidodismutasi (SOD) in cellule della granulosa in coltura.

Infine, utilizzando un modello tridimensionale per lo studio in vitro dell'angiogenesi, sono stati studiati gli effetti diretti del 2-ME sullo sviluppo di gemme vascolari da cellule endoteliali aortiche suine.

MODELLO SPERIMENTALE

Tutti i reagenti utilizzati sono stati forniti da Sigma Chemical Co Lt (St. Louis, MO, USA), ad eccezione di quelli specificatamente menzionati in dettaglio.

4.1 Raccolta delle ovaie

Le ovaie suine utilizzate per gli esperimenti provengono dal macello Sassi di Colorno (PR). La raccolta è avvenuta con cadenza settimanale, selezionando direttamente le ovaie integre, non contaminate e prive di follicoli cistici od emorragici; subito dopo la raccolta le ovaie sono state immerse in una soluzione di PBS sterile a 4°C, previa aggiunta di penicillina (500 UI/ml), streptomicina (500 µg/ml) e anfotericina B (3,75µg/ml).

Il trasporto al laboratorio è avvenuto entro un'ora dal recupero all'interno di un contenitore ermetico refrigerato.

Le ovaie sono state mantenute in condizioni di sterilità, ripulite dal tessuto interstiziale in eccesso, e sottoposte ad alcuni lavaggi con PBS ed etanolo al 70% (De la Fuente e Eppig, 2001).

4.2 Raccolta del fluido follicolare

I follicoli ovarici sono stati suddivisi in tre classi in funzione del loro diametro: piccoli (< 3 mm), medi (3-5 mm) e grandi (> 5 mm) (*figura 33*); la raccolta del fluido follicolare è stata eseguita mediante aspirazione in ambiente sterile con un ago da 26 gauge, raccogliendo pool follicolari fino al raggiungimento di 10 aliquote di 1 ml per ogni gruppo selezionato.

Si è quindi proceduto all'immediato stoccaggio a -80°C per un massimo di 2 settimane.



Figura 33. Classificazione dei follicoli ovarici suini in funzione del diametro.

4.3 Quantificazione dell'estradiolo-17 β e dei catecolestrogeni nel fluido follicolare

La quantificazione dell'estradiolo-17 β (E2) e dei catecolestrogeni 2/4-idrossiestradiolo (2/4-OH-E2) e 2-metossiestradiolo (2-ME) è stata eseguita mediante l'allestimento e la validazione di una metodica di separazione cromatografica in gas massa (SPE-GC-MS).

Aliquote di 1 ml di fluido follicolare campione sono state trattate con acetone in rapporto 1:1 al fine di precipitare le proteine. Dopo centrifugazione (1300 rpm per 10 minuti), i surnatanti sono stati caricati su una cartuccia SPE C18 (Supelco, Bellefonte, PA, USA), precedentemente condizionata con 3 ml di etere. L'eluizione è stata condotta utilizzando 4 ml di etere, evaporando poi a secchezza sotto flusso di azoto.

La reazione di derivatizzazione è stata eseguita aggiungendo al campione 15 μ l di toluene (solvente di reazione) e 5 μ l di anidride trifluoroacetica (agente derivatizzante) per 10 min a 30°C.

Il campione derivatizzato è stato quindi analizzato mediante GC-MS utilizzando un gas cromatografo HP 6890 Series Plus (Agilent Technologies, Milan, Italy) fornito di spettrofotometro di massa MSD 5973 (Agilent Technologies); l'elio è stato utilizzato quale carrier gassoso alla velocità di flusso 1 ml min⁻¹. Con un PTV iniettore (Agilent Technologies) la separazione cromatografica è stata eseguita in "splitless mode" (volume di iniezione: 0.5 μ l) a 70°C per 30 sec e 700°C min⁻¹ a 280°C, utilizzando una EZ-guard column (Varian, Torino, Italy) a 30 m x 0.25 mm, ϕ 0.25 μ m e applicando il seguente protocollo di temperature: 70°C, 30°Cmin⁻¹ a 230°C, 8 min

a 230°C, 10°Cmin⁻¹ a 250°C, 30°Cmin⁻¹ a 310°C, 15 min a 310°C. La fase MS è stata condotta operando in modalità “time scheduled-ion monitoring” (SIM) utilizzando i seguenti ioni: *m/z* 494, 381 and 339 per la quantificazione, e i corrispondenti “ion ratios” per l’identificazione qualitativa degli analiti.

L’acquisizione del segnale e la successiva elaborazione è stata ottenuta mediante HP Chemstation (Agilent Technologies).

I limiti di rilevazione dello strumento sono stati calcolati rispetto a standard di riferimento (purezza 98%, Steraloids, London, UK), preparati in acetone alla concentrazione di 100mg l⁻¹ e stoccati a -20°C per un massimo di 2 settimane.

La metodica di validazione è stata condotta seguendo i criteri bioanalitici scientificamente accettati; la ripetibilità e la precisione inter-saggio, espressi in termini di R.S.D. (%), sono stati calcolati su cinque replicati di tre livelli di concentrazione (LOQ, 5 µg kg⁻¹ e 20 µg kg⁻¹ rispettivamente) di ogni analita. Le medesime concentrazioni, negli stessi replicati, sono state utilizzate per testare l’affidabilità del metodo, espressa in termini di percentuale di recupero (RR %). È stata inoltre valutata la stabilità degli analiti nei fluidi follicolari alla temperatura di stoccaggio (-80°C) comparando le loro concentrazioni nei fluidi campionati per l’analisi con quelle di fluidi freschi.

4.4 Estrazione e coltura delle cellule della granulosa

Le cellule della granulosa dei follicoli grandi (> 5 mm) sono state raccolte mediante aspirazione del liquido follicolare utilizzando un ago da 26 gauge (*figura 34*), ed immediatamente sospese in medium di coltura (MC) contenente eparina (50 UI/ml). Si è quindi proceduto alla centrifugazione a 1200 rpm per 10 minuti, al fine di ottenere un pellet che è stato successivamente risospeso con cloruro di ammonio filtrato allo 0,9 % a 37°C per un minuto, per lisare ed eliminare gli eritrociti presenti.

Dopo ulteriore centrifugazione a 1200 rpm per 10 minuti, è stato eseguito il conteggio delle cellule presenti previa valutazione della loro vitalità tramite trypan blue (0,4%).



Figura 34. Aspirazione delle cellule della granulosa.

In base al tipo di esperimento, le cellule sono state piastrate a densità variabile e coltivate in MC costituito da M199 fornito da COSTAR (Broadway, Cambridge, MA, USA) supplementato con bicarbonato di sodio (2,2 ng/ml), albumina sierica

bovina (BSA 0,1%), penicillina (100 UI/ml), streptomicina (100 μ g/ml), anfotericina B (2,5 μ g/ml), selenio (5 ng/ml) e transferrina (5 μ g/ml).

In seguito alla semina le cellule sono state trattate con 2-ME (2-metossiestradiolo, C₁₉H₂₆O₃, M6383, sciolto in DMSO 10mg/ml) alla concentrazione di 1 μ M e incubate a 37°C in atmosfera umidificata (5% CO₂).

4.5 Saggi sui media di coltura delle cellule della granulosa

4.5.1 Produzione del VEGF

Per il dosaggio del VEGF, le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti alla concentrazione di 10^6 cellule/1 ml MC; i livelli di VEGF nei medium di coltura sono stati quantificati utilizzando un kit ELISA (Quantikine, R&D System, Minneapolis, MI, USA) messo a punto per il VEGF umano ma validato anche per quello suino (Barboni et al., 2000). E' stata utilizzata una curva standard con valori compresi tra 0,039 e 2 ng/ml e l'assorbanza è stata misurata utilizzando uno spettrofotometro Spectra Shell Microplate ad una lunghezza d'onda di 450 nm. La sensibilità del kit è di 8,79 pg/ml mentre i coefficienti di variazione intra ed inter-saggio sono sempre risultati inferiori al 7%.

4.5.2 Dosaggio dell'anione superossido (O_2^-)

Poiché il radicale superossido è in grado di ridurre il sale tetrazolico a formazano (Benov e Fridovich, 2002) sviluppando una reazione colorimetrica, per la sua quantificazione ci siamo avvalsi del "cell proliferation WST-1 test" (Roche, Mannheim, Germania). Brevemente, 10^4 cellule/200 μ l di MC sono state seminate in piastre da 96 pozzetti; durante le ultime 4 ore di incubazione sono stati aggiunti 20 μ l/pozzetto di reagente WST-1 (4-3-4-Iodophenyl-2-4nitrophenyl-2H-5-tetrazolio-1,3-benzene). L'assorbanza è stata quantificata leggendo in doppia lunghezza d'onda (450 contro 620 nm) mediante spettrofotometro Spectra Shell Microplate Reader (SLT Spectra, Milano, Italia).

4.5.3 Attività della superossidodismutasi (SOD)

Per l'esecuzione di questo saggio sono state seminate 2×10^5 cells/200 μ l CM in piastre da 96 pozzetti; dopo centrifugazione per 10 minuti a 400 x g ed eliminazione del surnatante, le cellule sono state lisate mediante aggiunta di Triton 1% in TRIS HCl (100 μ l/pozzetto) ed incubate in ghiaccio per 30 minuti. Sui lisati puri è stato poi eseguito il saggio di attività della SOD, utilizzando il "SOD Assay Kit" (Dojindo Molecular Technologies, Giappone).

Il test colorimetrico misura quantitativamente il formazano derivante dalla reazione tra il sale di tetrazolio (WST-1) e l'anione superossido, prodotto da una xantina ossidasi esogena: i livelli di O_2^- rilevabili costituiscono un indice indiretto dell'attività SOD del campione.

L'assorbanza dei campioni è stata letta contro una curva standard di riferimento (compresa tra 0.156 e 20 U/ml), a 450 nm contro 620 nm, mediante lettore per micropiastre Spectra Shell (SLT Spectra, Milano, Italia).

4.6 Saggio angiogenetico in gel di fibrina

Il modello per lo studio dello sviluppo vascolare (Grasselli et al., 2003) è stato allestito utilizzando una linea immortalizzata di cellule aortiche endoteliali porcine (AOC) (fornite gentilmente dal prof. José Yelamos dell'Hospital Universitario Virgen del la Arrixaca, El Palmar, 30120 Murcia, Spain), coltivate su un supporto sferico (microsfere cytodex-3) rivestito di gelatina, in una matrice gelatinosa di fibrina.

Le AOC, utilizzate in ogni esperimento al 25° passaggio, sono state coltivate in MC composto da M199 (COSTAR, Broadway, Cambridge, MA, USA) supplementato con bicarbonato di sodio (2,2 ng/ml), penicillina (100 UI/ml), streptomina (100µg/ml), anfotericina B (2,5 µ/ml), FCS 20% (GIBCO™, Invitrogen Corporation, UK) e incubate a 37°C in atmosfera umidificata (%5 CO₂).

La prima fase di allestimento del gel prevede l'adesione delle AOC alle microsfere; a tal fine, 12,5 mg di microsfere cytodex-3 sono state incubate per 3 ore con 1 ml di PBS sterile per una ottimale idratazione; dopo due lavaggi con PBS sterile ed uno con MC, sono state messe in fiaschette con 5 ml di MC.

Si è quindi proceduto all'aggiunta nella medesima fiaschetta di 5×10^5 di AOC, che sono quindi state coltivate per 24 h al fine di consentire la loro adesione alla superficie delle microsfere.

Successivamente, in piastre da 6 pozzetti sono stati preparati i gel di fibrina aggiungendo nel seguente ordine: 1710 µl di una soluzione di fibrinogeno (1 mg/ml PBS, pH 7,6), 40 µl di sospensione di microsfere ricoperte da AOC, 200 µl di VEGF (100 ng/ml) e 250 µl di trombina (1250 UI).

La polimerizzazione del gel di fibrina è stata ottenuta mediante incubazione per 30 min a 37°C, seguita da una fase di equilibratura di 1 ora con l'aggiunta di 2 ml di M199.

Trascorsa questa ultima fase l'M199 è stato aspirato con un ago da 26 gauge e si è quindi proceduto all'aggiunta del MC e del 2-ME 1 e 0,1 μ M.

Le piastre sono state incubate per 48 ore al termine delle quali sono state acquisite immagini fotografiche al fine di quantificare l'area di sviluppo vascolare.

4.6.1 Quantificazione dello sviluppo endoteliale

Mediante un programma per l'elaborazione di immagini, NIH program Scion Image Beta 4.02 (Scion Corporation, MA, USA; <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) è stata quantificata la proliferazione delle gemme endoteliali delle AOC sulle microsferette.

Dopo 48 ore di incubazione sono state acquisite 6 immagini fotografiche per ogni piastra; le immagini sono state quindi convertite in scala di grigi, ridotte del 50% (paintbrush Software, MS Office) e salvate in formato Bitmap 24 bit compatibile con il programma Scion. Mediante tale programma sono state effettuate le misure disegnando il perimetro dell'area occupata dalle AOC espressa in pixel. L'area della microsferetta (diametro 150 μm) è stata utilizzata come calibrazione interna per convertire il numero di pixel in mm^2 .

La validità di questa metodica di quantificazione della proliferazione delle AOC è stata confermata valutando la correlazione esistente tra l'area coperta dalle AOC sul gel di fibrina ed il numero di cellule effettivamente presenti nella stessa area. Si è infatti proceduto incubando le piastre con un colorante nucleare, il bis-benzimide (Hoechst 33258, 20 $\mu\text{g/ml}$ in PBS per 60 min), e quindi procedendo all'osservazione mediante microscopio a fluorescenza. L'esperimento è stato ripetuto 20 volte, sono state quindi misurate le aree delle AOC ed i nuclei delle cellule comprese nell'area stessa: i due parametri sono risultati strettamente correlati ($r=0,96$).

4.7 Analisi statistica

Ogni esperimento condotto sulle cellule della granulosa in coltura e sulle AOC in gel di fibrina è stato ripetuto almeno quattro volte (sei replicati per trattamento). I dati vengono presentati come valore medio \pm SEM (errore standard medio).

In tutti gli esperimenti, le differenze statisticamente significative sono state calcolate mediante ANOVA multifattoriale utilizzando il software Statgraphics (STC Inc., Rockville, MD, USA).

Quando è stata rilevata una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$), le medie sono state sottoposte al test F di Scheffè.

RISULTATI

5.1 Quantificazione del estradiolo-17 β e dei catecolestrogeni nel fluido follicolare

Il metodo SPE-GC-MS, utilizzato per la quantificazione del 17 β -estradiolo (E2) e dei catecolestrogeni 2/4-idrossiestradiolo (2/4-OH-E2) e 2-metossiestradiolo (2-ME) nel fluido follicolare, è stato validato seguendo le linee guida per i metodi bioanalitici [Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, May 2001] in termini di limiti di rivelazione (LOD) e quantificazione (LOQ), precisione, esattezza, recupero. I bassi valori di LOQ ottenuti (pari a 0.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$), l'eccellente precisione (CV% < 5%) e l'alto recupero (87,5% n=3) hanno permesso di attestare l'adeguatezza del metodo per la determinazione degli analiti a livelli di tracce in matrici complesse quali quelle dei fluidi follicolari.

Questo saggio ha permesso di quantificare il 17 β -estradiolo e i catecolestrogeni nel liquido antrale, evidenziando differenze significative ($p < 0,001$) nella loro concentrazione durante lo sviluppo follicolare (*tabella 2*).

	CLASSI FOLLICOLARI		
ANALITI	<i>piccoli</i>	<i>medi</i>	<i>grandi</i>
<i>E2</i>	23,40 ± 1,03 <i>a</i>	39,23 ± 0,27 <i>b</i>	51,98 ± 0,34 <i>c</i>
<i>2-OH-E2</i>	0,29 ± 0,04 <i>a</i>	1,24 ± 0,39 <i>b</i>	5,73 ± 0,11 <i>c</i>
<i>4-OH-E2</i>	-	1,76 ± 0,04 <i>a</i>	7,39 ± 0,03 <i>c</i>
<i>2-ME</i>	0,88 ± 0,03 <i>a</i>	3,91 ± 0,16 <i>b</i>	10,02 ± 0 <i>c</i>

Tabella 2. Concentrazione ($\mu\text{g/ml}$) di 17β -estradiolo (E2) e dei catecolestrogeni 2/4-idrossiestradiolo (2/4-OH-E2) e 2-metossiestradiolo (2-ME) nel fluido follicolare di follicoli suini a diverso grado di sviluppo. I dati sono espressi come medie \pm SEM. Lettere diverse indicano una differenza significativa ($p < 0,001$) tra le concentrazioni dello stesso analita.

5.2 Saggi sui media di coltura delle cellule della granulosa

5.2.1 Produzione del VEGF

La produzione basale di VEGF è risultata pari a 960 ± 42 pg/ml ed è risultata significativamente inibita ($p < 0,001$) dal 2-ME (*figura 35*).

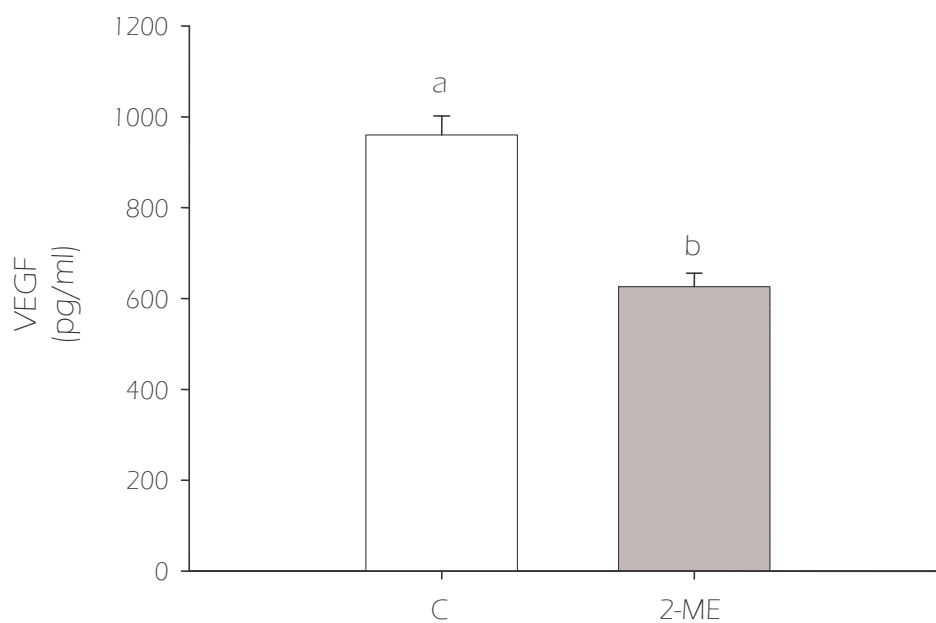


Figura 35. Effetto del trattamento con $1 \mu\text{M}$ di 2-ME sulla produzione di VEGF da parte di 10^6 cellule della granulosa. Lettere differenti indicano una differenza significativa ($p < 0,001$).

5.2.2 Dosaggio dell'anione superossido (O_2^-)

Come evidenziato nella *figura 36*, il trattamento con 2-ME ha prodotto un'inibizione ($p < 0,001$) del rilascio di O_2^- .

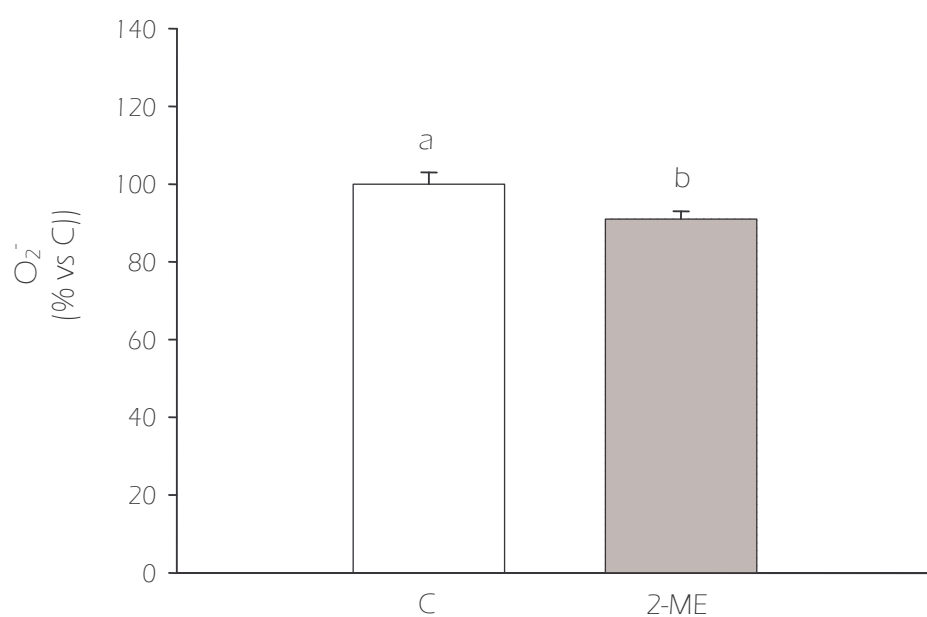


Figura 36. Effetto del trattamento con 1 μ M di 2-ME sul rilascio di O_2^- da parte di 10^4 cellule della granulosa. Lettere differenti indicano una differenza significativa ($p < 0,001$).

5.2.3 Attività della superossidodismutasi (SOD)

L'attività basale della SOD (280 ± 5 mU/ml) è risultata significativamente aumentata ($p < 0,05$) dal trattamento con il 2-ME (*figura 37*).

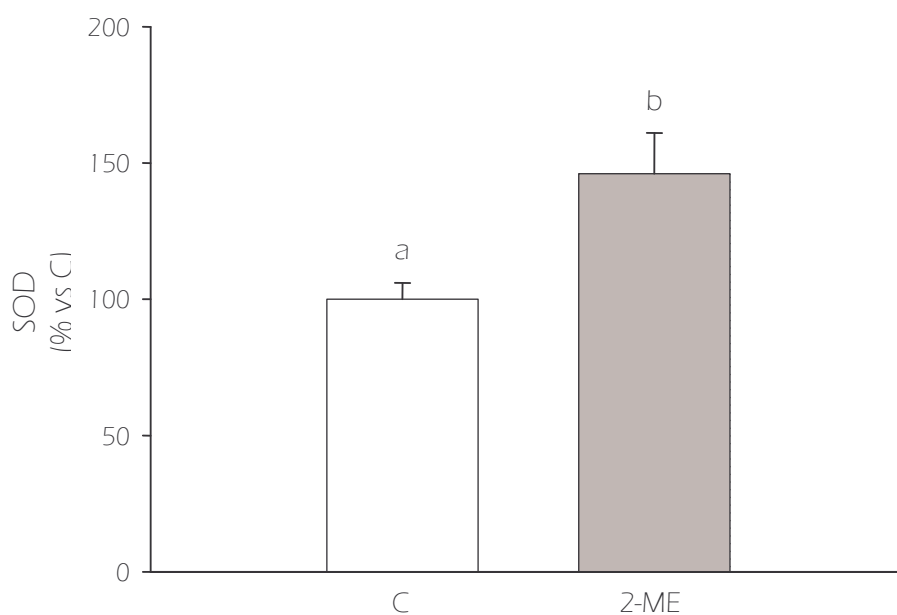


Figura 37. Effetto del trattamento con $1 \mu\text{M}$ di 2-ME sull'attività della SOD in 2×10^5 cellule della granulosa. Lettere differenti indicano una differenza significativa ($p < 0,05$).

5.3 Saggio angiogenetico in gel di fibrina

5.3.1 Quantificazione dello sviluppo endoteliale

Dopo 48 ore di incubazione, in presenza dei due dosaggi di 2-ME, è stata osservata una significativa diminuzione della proliferazione delle AOC (*tabella 3, figura 38*).

A tale proposito, e' opportuno rilevare che, mentre il trattamento 0,1 μM ha consentito di quantificare l'area dei prolungamenti endoteliali, il dosaggio pari a 1 μM non ha reso possibile tale misurazione poichè le cellule appaiono sferiche e staccate dalla superficie delle microsferette.

controlli	2-ME (0,1 μM)
$1,03 \pm 0,20 \text{ (mm}^2\text{)}a$	$0,61 \pm 0,07 \text{ (mm}^2\text{)}b$

Tabella 3. Area ricoperta dalle AOC (mm^2) nel gel di fibrina valutata dopo 48 ore di incubazione con trattamento 1 e 0,1 μM di 2-ME.

Lettere differenti indicano una differenza significativa ($p < 0,05$).

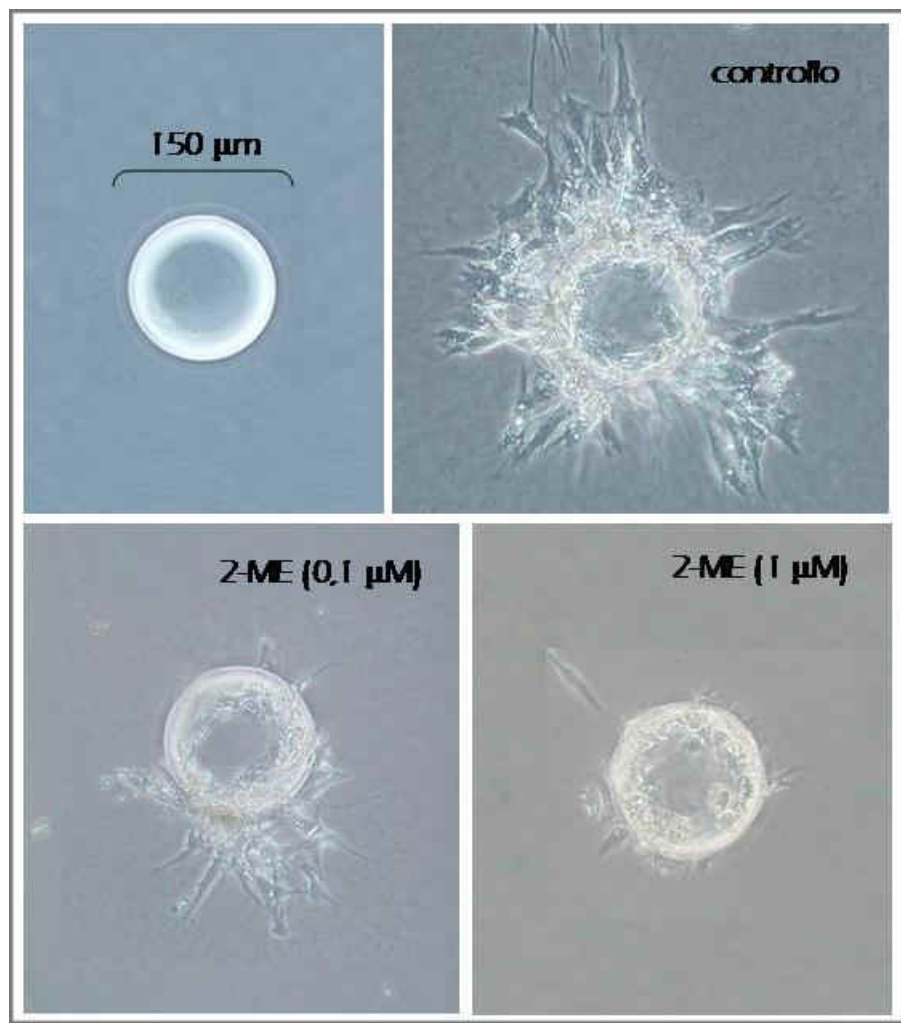


Figura 38. Fotografie al microscopio a contrasto di fase che mostrano l'effetto del 2ME (1 e 0,1 μM) sulla crescita delle AOC nel gel di fibrina dopo 48 ore di incubazione.

DISCUSSIONE

La fisiologia ovarica è strettamente connessa alla regolazione del processo angiogenetico: un adeguato sviluppo vascolare garantisce il supporto trofico locale per sostenere la crescita follicolare e lo sviluppo oocitario (Fraser e Duncan, 2005).

Il 2-metossiestradiolo (2-ME), un tempo considerato un metabolita inattivo del estradiolo-17 β , è oggi noto per i suoi potenziali effetti antiangiogenetici in vari tessuti (Kimbrow e Simons, 2006). Nonostante questa molecola sia oggi ampiamente investigata per il possibile impiego terapeutico, il suo ruolo nel controllo della neovascolarizzazione fisiologica ed i suoi meccanismi d'azione, soprattutto in vivo, non sono ancora completamente noti.

La breve emivita che caratterizza questo metabolita in circolo potrebbe precluderne un importante ruolo in qualità di ormone circolante, suggerendo invece l'ipotesi che i suoi effetti biologici siano conseguenti alla sua formazione diretta nei tessuti sede d'azione.

In questo contesto, il follicolo ovarico rappresenterebbe un sito di elezione (Shang et al., 2001): il fluido antrale si caratterizza infatti sia per un alto contenuto di estrogeni, che rappresentano quindi un abbondante substrato metabolico in questa sede, sia per un'elevata attività degli enzimi di sintesi dei catecolestrogeni (Hammond et al., 1986).

In letteratura sono disponibili diverse metodiche di quantificazione degli steroidi; poiché la maggior parte di queste tecniche è validata sul plasma, la loro trasposizione su una matrice complessa quale il liquido follicolare risulta piuttosto critica.

La composizione dei due fluidi biologici può infatti variare significativamente; ad esempio, è stato evidenziato che la barriera ematica follicolare è permeabile alle sole proteine plasmatiche con un peso molecolare inferiore a 500kDa (Cran et al. 1976).

Il liquido antrale contiene infatti proteine e molecole solubili della matrice extracellulare la cui concentrazione dipende dal passaggio per diffusione attraverso la parete follicolare (Irving-Rodgers et al., 2006).

La composizione del fluido antrale riflette inoltre l'attività metabolica delle strutture follicolari; ad esempio, le concentrazioni di colesterolo, trigliceridi e fosfolipidi nel liquido follicolare porcino sono decisamente inferiori di quelle sieriche (*tabella 4*).

costituente	unità	follicoli piccoli ($< 3\text{ mm}$)	follicoli medi ($3-5\text{ mm}$)	follicoli grandi ($> 5\text{ mm}$)	siero
proteine tot	g/dl	$6,0 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,2$
trigliceridi	mg/dl	19 ± 2	16 ± 1	15 ± 2	50 ± 3
fosfolipidi	mg/dl	56 ± 4	58 ± 4	46 ± 4	132 ± 10
colesterolo	mg/dl	36 ± 1	35 ± 2	28 ± 1	115 ± 1

Tabella 4. Composizione proteica e lipidica del fluido antrale porcino di follicoli di diverse dimensioni e del siero nella stessa specie (da Chang et al., 1976).

I dati sono espressi come media \pm SEM.

Molte delle conoscenze sulla biosintesi degli steroidi follicolari derivano dall'utilizzo delle metodiche immunoistochimiche, che consentono di localizzare la proteina

oggetto d'analisi mediante l'impiego di anticorpi: in questo caso, per i motivi citati precedentemente, fenomeni di cross reattività di un antisiero, trascurabili nel plasma, potrebbero essere invece rilevanti nel fluido follicolare, rendendo necessario l'allestimento di un antisiero specifico (Dehennin, 1990).

L'esigenza di separare e quindi quantificare i singoli analiti steroidei nelle diverse matrici biologiche ha portato all'allestimento di specifiche metodiche basate sulla separazione cromatografica.

Ad esempio, Zacharia et al. (2004) e Pinnella et al. (2001) hanno sviluppato metodi in gas-cromatografia di massa (GC/MS) per la determinazione dei catecolestrogeni nel plasma di ratto.

Un metodo in cromatografia liquida (LC/MS) con rilevamento ad ultravioletti è stato inoltre validato per la quantificazione del 2-ME nel plasma umano (Lakhani et al. 2004).

Recenti pubblicazioni descrivono saggi per la determinazione degli estrogeni nelle urine basati su metodiche di GC/MS con isotopi diluiti (Adlercreutz et al. 2004) e LC/MS (Mao et al. 2004).

La complessità e la viscosità del liquido antrale non consente la derivatizzazione diretta degli analiti, come operato nella maggior parte delle metodiche sopra riportate, rendendo invece necessario l'allestimento di specifiche metodiche per l'estrazione e la purificazione degli steroidi.

E' inoltre doveroso riportare che, sebbene esistano lavori precedenti nei quali sono stati quantificati gli steroidi nel fluido antrale di follicoli umani (Dehennin et al., 1984) ed equini (Silberzan et al., 1985), la determinazione di questi analiti anche in

tracce rende necessario l'allestimento di metodi analitici specifici e sensibili sia per la molecola sia per la specie considerata.

Il metodo SPE-GC-MS, validato in questo lavoro sperimentale (Bianchi et al., 2007), ha consentito di quantificare nel fluido follicolare suino l'estradiolo-17 β (E2), i catecolestrogeni idrossilici (2/4-OH-E2) e, per la prima volta, il 2-ME.

Rispetto alla maggior parte delle metodiche cromatografiche (GC-MS e LC-MS) utilizzate per la determinazione degli steroidi nei fluidi biologici, in questo studio è stata messa a punto una metodica GC-SIM-MS, ovvero operando nella fase MS in modalità "time scheduled-ion monitoring" (SIM).

La validità del nostro metodo di estrazione e purificazione ha consentito di quantificare gli steroidi estrogenici nel fluido antrale di follicoli suini a diverso grado di sviluppo; è stato inoltre possibile evidenziare differenze significative della concentrazione di ogni analita tra le diverse classi follicolari.

In particolare, in accordo con un precedente lavoro (Liu et al., 2002), è stato evidenziato un aumento significativo della concentrazione di E2 durante la crescita del follicolo, verosimilmente in conseguenza all'incremento dell'attività aromatasica che si verifica durante lo sviluppo follicolare nelle cellule della granulosa (Corbin et al. 2003).

Analogamente, i livelli degli idrossiestrogeni aumentano parallelamente alla crescita follicolare; questo dato trova conferma nel risultato precedente, poiché è stato riportato che l'attività degli enzimi idrossilasici (E-2/4-H) è direttamente proporzionale al substrato estrogenico (Hammond et al., 1986).

Anche i livelli di 2-ME aumentano significativamente durante lo sviluppo follicolare: le concentrazioni sono risultate quattro volte maggiori nei follicoli medi e dieci volte maggiori nei follicoli grandi rispetto a quelle dei piccoli.

Inoltre, in ogni classe follicolare analizzata, il 2-ME è il catecolestrogeno presente in maggiore quantità nel fluido antrale, suggerendo un suo possibile ruolo nella fisiologia ovarica.

In diverse condizioni sperimentali, è stato documentato il coinvolgimento del 2-ME nel controllo dell'apoptosi; in particolare, sono stati evidenziati effetti proapoptotici di questa sostanza in cellule della granulosa. E' stato infatti evidenziato un effetto proapoptotico del 2-ME su cellule della granulosa suine (Spicer e Hammond, 1989a) e bovine (Fotsis et al., 1994) coltivate in condizioni basali.

Queste osservazioni sono state confermate in lavori più recenti (Shang et al., 2001) nei quali si documenta inoltre che tale effetto può essere inibito dal trattamento con FSH.

Questa ultima evidenza appare particolarmente rilevante, poichè consente di ipotizzare una partecipazione del 2-ME nell'induzione apoptotica delle cellule della granulosa qualora nell'ambiente follicolare venga meno lo stimolo delle gonadotropine.

Gli effetti del 2-ME risulterebbero però autolimitanti, poichè una inadeguata stimolazione con FSH comporterebbe conseguentemente una riduzione del suo substrato di sintesi estrogenico.

Notevole rilevanza funzionale potrebbe invece assumere il possibile ruolo di questa sostanza sul controllo negativo della neovascolarizzazione a livello ovarico, che risulta ad oggi poco conosciuto.

In particolare, il 2-ME interferirebbe con il processo angiogenetico mediante azioni dirette e indirette. Queste ultime si esplicano ad esempio attraverso l'inibizione del fattore di trascrizione ipossico HIF-1 (Mabjeesh et al., 2003), cui consegue una inibizione della trascrizione di VEGF e quindi della sua secrezione (Mooberry et al., 2003).

Questo meccanismo assumerebbe particolare significato a livello del follicolo, dove la progressiva condizione ipossica che si instaura durante il suo sviluppo rappresenterebbe il principale stimolo per la secrezione di VEGF da parte delle cellule della granulosa (Dor et al., 2001).

I dati emersi in questo lavoro dimostrano che il 2-ME è in grado di inibire la produzione del VEGF da parte delle cellule della granulosa, suffragando l'ipotesi di un suo ruolo nel controllo fisiologico della neogenesi vascolare ovarica.

Recentemente è stato dimostrato (Hagen et al., 2004) che il 2-ME interagisce a livello mitocondriale con la catena di trasporto degli elettroni, inducendo la produzione di radicali liberi: queste molecole sembrano implicate nel processo angiogenetico mediante stabilizzazione del fattore di trascrizione ipossico HIF-1 (Pagè et al., 2002).

Nell'ambiente follicolare i radicali liberi vengono prodotti dalle cellule della granulosa durante la steroidogenesi (Cassano et al., 1999). La loro produzione è contrastata da potenti difese antiossidanti che li mantengono a livelli fisiologici nell'ambiente follicolare (Agarwal et al., 2005), dove svolgerebbero un ruolo importante nella trasduzione del segnale ipossico (Schroedl et al., 2002).

Sebbene la capacità del 2-ME di alterare lo stato redox non sembra verificarsi in tutti i sistemi cellulari (Mooberry et al., 2003), la sua azione antiangiogenetica

potrebbe dipendere anche da un'alterazione dello stato redox nelle cellule della granulosa.

I nostri dati evidenziano infatti un effetto stimolatorio del 2-ME sull'attività della superossidodismutasi (SOD) la quale, detossificando l'anione superossido (O_2^-), genera perossido di idrogeno (H_2O_2).

In altri modelli sperimentali gli effetti del 2-ME sull'attività della SOD appaiono discordanti, essendo stati evidenziati sia una inibizione dose-dipendente (Golab et al., 2003) sia una mancanza di effetto (Kachadourian et al., 2001).

Come suggerito da Mooberry et al (2003), queste differenze potrebbero dipendere da un'azione specifica sui diversi tipi o linee cellulari.

La diminuzione dei livelli di O_2^- indotta dal trattamento con 2-ME nel nostro sistema colturale, assume particolare significato, poiché in uno studio precedente (Basini et al., 2004a) è stato dimostrato che l' O_2^- stimola una risposta angiogenetica nelle cellule della granulosa.

Inoltre, in un recente lavoro (Basini et al., 2008) nel quale è stato valutato lo stato redox dei fluidi follicolari suini a diverso grado di sviluppo, i livelli di O_2^- sembrano mantenersi costanti durante la crescita antrale, mentre quelli di H_2O_2 progressivamente si riducono.

Questi dati troverebbero conferma nell'evidenza che fattori angiogenetici, come ad esempio il VEGF, e ipossia (Harfouche et al., 2005) attivano la NADPH ossidasi, responsabile di una bassa ma costante produzione di O_2^- nelle cellule endoteliali.

Alcuni autori (Kroll e Czyzyk-Krzeska, 1998; Canbolat et al., 1998) hanno invece ipotizzato che il H_2O_2 rappresenti un segnale di arresto per l'angiogenesi follicolare,

fungendo come un trasduttore di normossia attraverso l'inibizione dell'espressione dell'HIF-1.

I dati emersi in questo lavoro consentono quindi di ipotizzare un ruolo del 2-ME nel controllo della neovascolarizzazione ovarica, attraverso una inibizione della produzione di VEGF da parte delle cellule della granulosa, probabilmente mediata da una alterazione del loro stato redox.

Come precedentemente accennato, l'effetto antiangiogenetico potrebbe inoltre avvalersi di meccanismi antiproliferativi e proapoptotici diretti sulle cellule endoteliali attivate, ipotesi suffragata dall'espressione enzimatica dei suoi enzimi di sintesi nelle cellule vascolari (Dubey et al. 2004).

Numerosi studi (Brooks et al., 1994; Stromblad et al., 1996; Yue et al 1997; Shang et al., 2001) hanno evidenziato modificazioni morfologiche caratteristiche dell'apoptosi in cellule endoteliali trattate con 2-ME, nonché inibizione della migrazione sia in vitro sia in vivo.

Il nostro modello sperimentale in gel di fibrina, ha confermato l'effetto inibitorio del 2-ME sulla crescita delle cellule endoteliali aortiche suine. Nello specifico, mentre il dosaggio 0,1 μM ha significativamente ridotto i prolungamenti endoteliali e quindi l'area vascolare, la concentrazione al dosaggio maggiore (1 μM) ha comportato modificazioni morfologiche cellulari e distaccamento delle stesse dalla matrice di fibrina.

Risultati analoghi sono stati riportati da altri autori, ad esempio il trattamento con 0,5 μM di 2-ME ha ridotto la proliferazione di cellule endoteliali suine, mentre alla dose 1 μM ha inibito anche la migrazione endoteliale, con una soppressione del

40% alla concentrazione 2 μM , in associazione a fenomeni apoptotici (Shang et al., 2001).

In cellule endoteliali di arteria polmonare bovina (BPAEC) il 2-ME ha causato modificazioni morfologiche caratteristiche di eventi apoptotici, quali assottigliamento cellulare, vescicole intracitoplasmatiche, condensazione citoplasmatica e nucleare già alla concentrazione 0,3 μM raggiungendo il massimo effetto a 2-3 μM (Yue et al., 1997).

I nostri risultati indicano che la massima concentrazione di 2-ME raggiunta nei follicoli preovulatori suini è pari a 0,03 μM , in accordo con quanto riportato nella specie umana (Dehennin et al., 1984), mentre nella cavalla sono stati indicati (Silberzahn et al., 1985) valori maggiori (0,82 μM).

Come suggerito da Shang et al. (2001) è verosimile che a livello cellulare sia presente una concentrazione maggiore di questo metabolita, rispetto a quanto evidenziato nei liquidi antrali delle diverse specie.

CONCLUSIONI

Il metodo di analisi allestito e validato in questo lavoro sperimentale ha consentito di confermare la presenza del 2-metossiestradiolo (2-ME) nel liquido antrale di follicoli suini, evidenziando concentrazioni significativamente crescenti durante lo sviluppo follicolare.

Questo aumento sarebbe pertanto coincidente con un parallelo incremento del rimodellamento vascolare nello strato tecale, sul quale il 2-ME potrebbe intervenire ostacolando un'eccessiva proliferazione vascolare e contrastando la prematura migrazione delle cellule endoteliali attraverso la membrana basale.

In particolare, il 2-ME potrebbe agire quale regolatore autocrino e/o paracrino dell'angiogenesi follicolare attraverso effetti che si esplicano sia direttamente sulle cellule endoteliali sia sulla produzione di VEGF da parte delle cellule della granulosa mediante una possibile alterazione del loro stato redox.

BIBLIOGRAFIA

- Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. 2003 *Reproduction*. 125(5):759-767.
- Acosta TJ. Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. 2007 *J Reprod Dev*. 53(1):39-44.
- Adlercreutz H, Kiuru P, Rasku S, Wähälä K, Fotsis T. An isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the simultaneous assay of estrogens and phytoestrogens in urine. 2004 *J Steroid Biochem Mol Biol*. 92(5):399-411.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. 2005 *Reprod. Biol. Endocrinol*. 14:3-28.
- Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. 2006 *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*. 18:325-332.
- Alak BM, Coskun S, Friedman CI, Kennard EA, Kim MH, Seifer DB. Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis in vitro. 1998 *Fertil Steril*. 70(6):1126-1130.
- Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. An activated form of transforming growth factor beta is produced by cultures of endothelial cells and pericytes. 1998 *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 86:4544-4548.
- Arci A, Oral E, Bukulmez O, Buradagunta S, Enging O, Olive DL. Interleukin-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells. 1996 *Endocrinology*. 13:3762-3769.
- Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. 1998 *Circ Res*. 83(3):233-240.
- Aziz KE, Wakefield D. Modulation of endothelial cell expression of ICAM-1, E-selectin, and VCAM-1 by beta-estradiol, progesterone, and dexamethasone. 1996 *Cell Immunol*. 167:79-85.

- Ball P, Haupt M, Knuppen R. Biogenesis and metabolism of catecholestrogens in vitro. 1983 In catechol estrogens (eds Merriam G.R. e Lipsett M.B.) Raven Press, New York p.91.
- Ball P, Knuppen R. Catecholestrogens (2-and 4-hydroxyoestrogens): chemistry, biogenesis, metabolism, occurrence and physiological significance. 1980 Acta Endocrinol Suppl (Copenh) 232:1-127.
- Banerjee SN, Sengupta K, Banerjee S, Saxena NK, Banerjee SK. 2-Methoxyestradiol exhibits a biphasic effect on VEGF-A in tumor cells and upregulation is mediated through ER-alpha: a possible signaling pathway associated with the impact of 2-ME2 on proliferative cells. 2003 Neoplasia. 5(5):417-426.
- Barbieri M, Carinci P. Embriologia. 1997 2^aediz, cap 4, C.E.A. Ambrosiana. Milano. 60-75.
- Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. 2000 Biol Reprod. 63(3):858-864.
- Basini G, Grasselli F, Bianco F, Tirelli M, Tamanini C. Effect of reduced oxygen tension on reactive oxygen species production and activity of antioxidant enzymes in swine granulosa cells. 2004a Biofactors. 20(2):61-69.
- Basini G, Bianco F, Grasselli F, Tirelli M, Bussolati S, Tamanini C. The effects of reduced oxygen tension on swine granulosa cell. 2004b Regul Pept. 120(1-3):69-75.
- Basini G, Bianco F, Santini S, Grasselli F. Angiogenic activity of swine granulosa cells: effects of hypoxia and the role of VEGF. 2005 Vet. Res. Commun. 2:157-159.
- Basini G, Simona B, Santini SE, Grasselli F. Reactive oxygen species and anti-oxidant defences in swine follicular fluids. 2008 Reprod Fertil Dev. 20(2):269-274.
- Becker CM, Rohwer N, Funakoshi T, Cramer T, Bernhardt W, Birsner A, Folkman J, D'Amato RJ. 2-Methoxyestradiol Inhibits Hypoxia-Inducible Factor-1 {alpha} and Suppresses Growth of Lesions in a Mouse Model of Endometriosis. 2008 Am J Pathol. 172(2):534-44.
- Benifla JL, Bringuier AF, Sifer C, Porcher R, Madelenat P, Feldmann G. Vascular endothelial growth factor, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in the follicular fluid of patients undergoing IVF. 2001 Hum Reprod. 16(7):1376-1381.
- Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. 1999 J Clin Invest. 103(2):159-165.
- Bianchi F, Careri M, Mangia A, Musci M, Santini SE, Basini G. Porcine follicular fluids: comparison of solid-phase extraction and solid-phase dispersion for the GC-MS determination of hormones during follicular growth. 2007 J Pharm Biomed Anal. 44(3):711-717.

- Biliran H Jr, Sheng S. Pleiotrophic inhibition of pericellular urokinase-type plasminogen activator system by endogenous tumor suppressive maspin. 2001 *Cancer Res.* 61(24):8676-8682.
- Binder BR, Mihaly J, Prager GW. uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. 2007 *Thromb Haemost.* 97(3):336-342.
- Blavier L, Henriët P, Imren S, Declerk YA. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer. 1999 *Ann N Y Acad Sci.* 878:108-119.
- Bogaczewicz J, Dudek W, Zubilewicz T, Wroński J, Przywara S, Chodorowska G, Krasowska D. The role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in angiogenesis 2006 *Pol Merkur Lekarski.* 21(121):80-85.
- Boonyaparakob U, Gadsby JE, Hedgpeth V, Routh PA, Almond GW. Expression and localization of hypoxia inducible factor-1 alpha mRNA in the porcine ovary. 2005 *Can J Vet Res.* 69(3):215-222.
- Bortolami R, Callegari E, Beghelli V. Anatomia degli animali domestici. 2000 Ed agricole, Bologna, pp 353-357.
- Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. 2000 *Biochim Biophys Acta.* 1477(1-2):267-283.
- Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. 1994 *Cell.* 79(7):1157-1164.
- Canbolat O, Fandrey J, Jelkmann W. Effects of modulators of the production and degradation of hydrogen peroxide on erythropoietin synthesis. 1998 *Respir Physiol.* 114(2):175-183.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. 2000 *Nat Med.* 8(3):389-395.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. 2003 *Nat Med.* 9(6):653-660.
- Cassano E, Tosto L, Balestrieri M, Zicarelli L, Abrescia P. Antioxidant defense in the follicular fluid of water buffalo. 1999 *Cell Physiol Biochem.* 9(2):106-116.
- Chang SCS, Jones JD, Ellefson RD, Ryan RJ. The porcine ovarian follicle : selected chemical analysis of follicular fluid at different development stages. 1976 *Biol of Reprod.* 15:321-328.
- Charnock-Jones D, Sharkey A, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Boocock CA, Smith SK. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. 1993 *Biol Reprod.* 48:1120-1128.

- Christenson LK, Stouffer RL. Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate corpus luteum during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. 1996 *Endocrinology*. 137:367-374.
- Christenson LK, Stouffer RL. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. 1997 *J Clin Endocrinol Metab*. 82:2135-2142.
- Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptor. 2003 *Biochem Soc Transact*. 31(1):20-24.
- Clark JG. The origin, development and degeneration of the blood vessels of the human ovary. 1900 *Johns Hopkins Hosp Rep*. 9:593-676.
- Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, Maeshima Y, Hopfer H, Takahashi K, Volk R, Zamborsky ED, Herman S, Sarkar PK, Ericksen MB, Dhanabal M, Simons M, Post M, Kufe DW, Weichselbaum RR, Sukhatme VP, Kalluri R. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. 2000 *Cancer Res*. 60(9):2520-2526.
- Corbin CJ, Moran FM, Vidal JD, Ford JJ, Wise T, Mapes SM, Njar VC, Brodie AM, Conley AJ. Biochemical assessment of limits to estrogen synthesis in porcine follicles. 2003 *Biol Reprod*. 69(2):390-397.
- Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases generate angiotatin: effects on neovascularization. 1998 *J Immunol*. 161(12):6845-6852.
- Couse JF, Yates MM, Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptor- α is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. 2005 *Endocrinology*. 146:3247-3262.
- Cran DG, Moor RM, Hay MF. Permeability of ovarian follicles to electron-dense macromolecules. 1976 *Acta Endocrinol (Copenh)*. 82(3):631-636.
- Cullinan-Bove K, Koos R. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen induced increases in uterine capillary permeability and growth. 1993 *Endocrinology*. 133:829-837.
- D'Angelo G, Martini JF, Iiri T, Fantl WJ, Martial J, Weiner RI. 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. 1999 *Mol Endocrinol*. 13(5):692-704.
- Dawling S, Roodi N, Parl FF. Methoxyestrogens exert feedback inhibition on cytochrome P450 1A1 and 1B1. 2003 *Cancer Res*. 63(12):3127-3132.

- De La Fuente R, Epping JJ. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. 2001 *Dev Biol.* 299 (1):224-236.
- De Ponti C, Carini R, Alchera E, Nitti MP, Locati M, Albano E, Cairo G, Tacchini L. Adenosine A2a receptor-mediated, normoxic induction of HIF-1 through PKC and PI-3K-dependent pathways in macrophages. 2007 *J Leukoc Biol.* 82(2):392-402.
- Dehennin L, Blacker C, Reiffsteck A, Scholler R. Estrogen 2-, 4-, 6- or 16-hydroxylation by human follicles shown by gas chromatography-mass spectrometry associated with stable isotope dilution. 1984 *J Steroid Biochem.* 20(1):465-471.
- Dehennin L e Scholler R. Follicular fluid levels of 19-norsteroid and corticosteroids in relation to the androgen-to-estrogen conversion in preovulatory human follicles. 1987 *Steroids.* 50:613-614.
- Dehennin L, Nahoul K, Scholler R. Steroid 21-hydroxylation by human preovulatory follicles from stimulated cycles: a mass spectrometrical study of deoxycorticosterone, 21-hydroxypregnenolone and 11-deoxycortisol in follicular fluid. 1987a *J Steroid Biochem.* 26(3):337-343.
- Dehennin L, Jondet M, Scholler R. Androgen and 19-norsteroid profiles in human preovulatory follicles from stimulated cycles: an isotope dilution-mass spectrometric study. 1987b *J Steroid Biochem.* 26(3):399-405.
- Dehennin L. Estrogens, androgens, and progestins in follicular fluid from preovulatory follicles: identification and quantification by gas chromatography/mass spectrometry associated with stable isotope dilution. 1990a *Steroids.* 55(4):181-184.
- Dehennin L. Cortisol determination in follicular fluid. 1990b *Fertil Steril.* 54(2):366-367.
- Dejana E :Endothelial cell-cell junctions: happy together. 2004 *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:261-270.
- Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, Bergh AR, Lee C, Abramson LP, Cornwell ML, Pins MR, Borensztajn J, Crawford SE. Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. 2003 *Nat Med.* 9(6):774-780.
- Dor V, Di Donato M, Sabatier M, Montiglio F, Civaia F. Left ventricular reconstruction by endoventricular by circular patch plasty repair: a 17-year experience. 2001 *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 74:429-438.
- Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC, Imthurn B. Catecholamines block the antimitogenic effect of estradiol on human coronary artery smooth muscle cells. 2004 *J Clin Endocrinol Metab.* 89(8):3922-3931.

- Duncan WC, Hillier SG, Gay E, Bell J, Fraser HM :Connective tissue growth factor (CTGF) expression in the human corpus luteum: paracrine regulation by human chorionic gonadotropin (hCG). 2005 *J Clin Endocrinol Metab*. 90:5366-5376.
- Dvorak HF, Orenstein NS, Carvalho AC, Churchill WH, Dvorak AM, Galli SJ, Feder J, Bitzer AM, Rypsc J, Giovenco P. Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. 1979 *J Immunol*. 122(1):166-174.
- Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. 1999 *Curr Top Microbiol Immunol*. 237:97-132.
- Dvorak HF. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor: a crucial cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. 2002 *J Clin Oncol*. 20(21):4368-4380.
- Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. 2007 *Prog Histochem Cytochem*. 42(3):115-170.
- Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. 1994 *Biol Reprod*. 50(2):233-238.
- Fateh M, Ben-Rafael Z, Benadiva CA, Mastroianni L Jr, Flickinger GL. Cortisol levels in human follicular fluid. 1989 *Fertil Steril*. 51(3):538-541.
- Feng WG, Sui HS, Han ZB, Chang ZL, Zhou P, Liu DJ, Bao S, Tan JH. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. 2007 *Theriogenology*. 67(8):1339-1350.
- Ferrara N, Clapp C, Weiner R. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. 1991 *Endocrinology*. 129(2):896-900.
- Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T, Peale F :Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. 2003 *Am J Path*. 162:1881-1893.
- Fishman J. Aromatic hydroxylation of estrogens. 1983 *Annu Rev Physiol*. 45:61-72.
- Ford JJ, Howard HJ. Activin inhibitor of estradiol and progesterone production in porcine granulosa cells. 1997 *J Anim Sci*. 75(3):761-766.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. 1996 *Mol Cell Biol*. 16:4604-4613.

- Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, Adlercreutz H, Montesano R, Nawroth PP, Schweigerer L. The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. 1994 *Nature*. 368:237-239
- Fraser HM, Duncan WC. Vascular morphogenesis in the primate ovary. 2005 *Angiogenesis*. 8(2):101-116.
- Fraser HM, Wulff C. Angiogenesis in the primate ovary. 2001 *Reprod Fertil Dev*. 13(7-8):557-66.
- Fraser HM, Wilson H, Rudge JS, Wiegand SJ :Single injections of vascular endothelial growth factor trap block ovulation in the macaque and produce a prolonged, dose-related suppression of ovarian function. 2005 *J Clin Endocrinol Metab*. 90:1114-1122
- Friedman A, Weiss S, Levy N, Meidan R. Role of tumor necrosis factor alpha and its type I receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells. 2000 *Biol Reprod*. 63(6):1905-1912.
- Gaetje R. IGF-1 and EGF influence on steroid secretion and morphology of human granulosa cells of IVF-cycle and natural cycle in vitro. 1994 *Clin Exp Obstet Gynecol*. 21:14-23.
- Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell specific receptor tyrosine kinases:VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. 1999 *Genes Dev*. 3:1055-1066.
- Garrido G, Saule S, Gospodarowicz D. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. 1993 *Growth Factors*. 8:109-117.
- Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. 1998 *J Biol Chem*. 273(21):13313-13316.
- Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. 2000 *Fertil Steril*. 74(3):429-438.
- Goede VT, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin H.G. Analysis of blood vessels maturation process during cycle ovarian angiogenesis. 1998 *Lab Invest*. 78:1385-1394.
- Golab J, Nowis D, Skrzycki M, Czeczot H, Baranczyk-Kuzma A, Wilczynski GM, Makowski M, Mroz P, Kozar K, Kaminski R, Jalili A, Kopec' M, Grzela T, Jakobisiak M. Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor. 2003 *J Biol Chem*. 278(1):407-14.
- Goldhar AS, Vonderhaar BK, Trott JF, Hovey RC. Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1. 2005 *Mol Cell Endocrinol*. 232(1-2):9-19.

- Gook DA, Edgar DH, Borg J, Martic M. Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. 2008 Hum Reprod. 23(2):394-402.
- Gorlach A, Berchner-Pfannschmidt U, Wotzlaw C, Cool RH, Fandrey J, Acker H. Reactive oxygen species modulate HIF-1 mediated PAI-1 expression: involvement of the GTPase Rac1. 2003 Thromb. Haemost. 89:926-935.
- Gospodarowicz D. Isolation and characterization of acidic and basic fibroblast growth factor. 1987 Methods Enzymol. 147:106-119.
- Grasselli F, Basini G, Bussolati S, Tamanini C. Effects of VEGF and bFGF on proliferation and production of steroids and nitric oxide in porcine granulosa cells. 2002 Reprod Domest Anim. 37:362-368.
- Grasselli F, Basini G, Tirelli M, Cavalli V, Bussolati S, Tamanini C. Angiogenic activity of porcine granulosa cells co-cultured with endothelial cells in a microcarrier-based three-dimensional fibrin gel. 2003 J Physiol Pharmacol. 54(3):361-370.
- Grasselli F, Basini G, Bussolati S, Bianco F. Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, modulates redox status and functional parameters of cultured swine granulosa cells. 2005 Reprod Fertil Dev. 17(7):715-720.
- Greenaway JB, Connor K, Pedersen HG, Coomer BL, LaMarre J, Petrik J. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. 2004 Endocrinology. 145:2896-2905.
- Greenaway J, Gentry PA, Feige JJ, LaMarre J, Petrik JJ. Thrombospondin and vascular endothelial growth factor are cyclically expressed in an inverse pattern during bovine ovarian follicle development. 2005 Biol Reprod. 72(5):1071-1078.
- Gruemmer R, Motejlek K, Berghaus D, Weich HA, Neulen J. Regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor (sFlt-1/sVEGFR-1) expression and release in endothelial cells by human follicular fluid and granulosa cells. 2005a Reprod Biol Endocrinol. 3:57.
- Gruemmer R, Klein-Hitpass L, Neulen J. Regulation of gene expression in endothelial cells: the role of human follicular fluid. 2005b J Mol Endocrinol. 34(1):37-46.
- Grummer RR, Carroll DJ. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. 1988 Anim Sci. 66(12):3160-73.
- Guthridge M, Schmitt J, Bertolini J, Cowling J, Runting A, Katsahambas S, Drummond AE, Hearn MT. Studies on basic fibroblast growth factor (FGF-beta) gene expression in the rat and pig ovary using in situ hybridization and quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction techniques. 1992 EXS. 61:219-229.

- Hagen T, D'Amico G, Quintero M, Palacios-Callender M, Hollis V, Lam F, Moncada S. Inhibition of mitochondrial respiration by the anticancer agent 2-methoxyestradiol. 2004 *Biochem Biophys Res Commun.* 322(3):923-929.
- Hammond JM, Hersey RM, Walega MA, Weisz J. Catecholestrogen production by porcine ovarian cells. 1986 *Endocrinology.* 118(6):2292-2299.
- Harfouche R, Malak NA, Brandes RP, Karsan A, Irani K, Hussain SN. Roles of reactive oxygen species in angiopoietin-1/tie-2 receptor signaling. 2005 *FASEB J.* 19:1728–1730.
- Harlow CR, Hillier SG :Connective tissue growth factor in the ovarian paracrine system. 2002 *Mol Cell Endocrinol.* 187:23-27.
- Havelock JC, Rainey WE, Carr BR. Ovarian granulosa cell lines. 2004 *Mol. Cell. Endocrinol.* 228:67–78.
- Hayashi KG, Acosta TJ, Tetsuka M, Berisha B, Matsui M, Schams D :Involvement of angiopoietin-tie system in bovine follicular development and atresia: RNA expression in theca interna and effect on steroid secretion. 2003 *Biol Reprod.* 69:2078-2084.
- Hillier SG, Miró F. Inhibin, activin, and follistatin. Potential roles in ovarian physiology. 1993 *Ann N Y Acad Sci.* 687:29-38.
- Hirshfield AN. Stathmokinetik analysis of granulosa cell proliferation in antral follicles of cyclic rats. 1984 *Biol Reprod.* 31(1):52-58.
- Hobson B, Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. 1984 *Br J Cancer.* 49(4):405-413.
- Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. 2000 *Nature.* 407:390-395.
- Hudson KE, Hillier SG. Catechol oestradiol control of FSH-stimulated granulosa cell steroidogenesis. 1985 *J Endocrinol.* 106(1):R1-4.
- Hudson KE, Wickings EJ, Hillier SG. Effects of 2-hydroxyoestradiol, oestradiol and testosterone on FSH-induction of catecholamine- and gonadotrophin-responsive progesterone biosynthesis in rat granulosa cell cultures. 1987 *J Steroid Biochem.* 28(3):267-272.
- Huynh K, Jones G, Thouas G, Britt KL, Simpson ER, Jones ME. Estrogen is not directly required for oocyte developmental competence. 2004 *Biol. Reprod.* 70:1263–1269.
- Hyder SM, Stancel GM. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. 1999 *Mol Endocrinol.* 13:806-811.
- Irving-Rodgers HF, Rodgers RJ. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. 2006 *Semin Reprod Med.* 24(4):195-203.

- Jablonka-Shariff A, Fricke PM, Grazul-Bilska AT, Reynolds LP, Redmer DA. Size, number, cellular proliferation and atresia of gonadotropin-induced follicles in ewes. 1994 Biol Reprod. 51:531-540.
- Jaffe RB. Importance of angiogenesis in reproductive physiology. 2000 Semin Perinatol. 24(1):79-81.
- Jamnongjit M, Gill A, Hammes SR. Epidermal Growth Factor Receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. 2005 Proc. Natl. Acad. Sci. 102:16257-16261.
- Jamnongjit M, Hammes SR. Ovarian Steroids: The good, the bad, and the signals that raise them. 2006 Cell Cycle. 5:1178-1183.
- Jouvenot M, Pellerin I, Alkhalaf M, Marechal G, Royez M, Adessi G. Effects of 17 beta-estradiol and growth factors on c-fos gene expression in endometrial epithelial cells in primary culture. 1990 Mol Cell Endocrinol. 72:149-157.
- Kachadourian R, Liochev SI, Cabelli DE, Patel MN, Fridovich I, Day BJ. 2-methoxyestradiol does not inhibit superoxide dismutase. 2001 Arch Biochem Biophys. 392(2):349-53.
- Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. 1995 Am J Pathol. 146(1):157-65.
- Karumanchi SA, Jha V, Ramchandran R, Karihaloo A, Tsiokas L, Chan B, Dhanabal M, Hanai JI, Venkataraman G, Shriver Z, Keiser N, Kalluri R, Zeng H, Mukhopadhyay D, Chen RL, Lander AD, Hagihara K, Yamaguchi Y, Sasisekharan R, Cantley L, Sukhatme VP. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. 2001 Mol Cell. 7(4):811-822.
- Kidder G.M., Mhawi A.A. Gap junction and ovarian folliculogenesis. 2002 Reproduction. 123, 613-620.
- Kimbro KS, Simons JW. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. 2006 Endocr Relat Cancer. 13(3):739-749.
- Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. 2003 Acta Biochim Pol. 50(1):49-59.
- Kisliouk T, Podlovni H, Spänhel-Borowski K, Ovadia O, Zhou QY, Meidan R. Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. 2005 Endocrinology. 146:3950-3958.
- Klagsbrun M, D'Amore P. Regulator of angiogenesis. 1991 Ann Rev Physiol. 53:217-239.
- Klagsbrun M, D'Amore P. Vascular endothelial growth factor and its receptor. 1996 Cytok Grow Fac Rev. 7(3):259-270.

- Knobil E, Neill JD, Ewing LL, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW. The physiology of reproduction 1988, cap10, Raven Press New York, 343-369.
- Kreuger J, Matsumoto T, Vanwildemeersch M, Sasaki T, Timpl R, Claesson-Welsh L, Spillmann D, Lindahl U. Role of heparan sulfate domain organization in endostatin inhibition of endothelial cell function. 2002 EMBO J. 21(23):6303-6311.
- Kroll SL, Czyzyk-Krzeska MF.: Role of H₂O₂ and heme-containing O₂ sensors in hypoxic regulation of tyrosine hydroxylase gene expression. 1998 Am J Physiol. 274(1 Pt 1):C167-74.
- Lakhani NJ, Sparreboom A, Dahut WL, Venitz J, Figg WD. Determination of the antiangiogenesis agent 2-methoxyestradiol in human plasma by liquid chromatography with ultraviolet detection. 2004 J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 806(2):289-293.
- Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. 2007 Circ Res. 100(6):782-794.
- LaVallee TM, Zhan XH, Herbstritt CJ, Kough EC, Green SJ, Pribluda VS. 2-Methoxyestradiol inhibits proliferation and induces apoptosis independently of estrogen receptors alpha and beta. 2002 Cancer Res. 62(13):3691-3697.
- LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N :Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. 2001 Nature. 412:877-884.
- Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, Dewulf J, de Kruif A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. 2004 Theriogenology. 62(6):1131-1143.
- Lewis CE, De Palma M, Naldini L. Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. 2007 Cancer Res. 67(18):8429-8432.
- Lijnen HR, Uguw F, Bini A, Collen D. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). 1998 Biochemistry. 37(14):4699-4702.
- Liu RH, Li YH, Jiao LH, Wang XN, Wang H, Wang WH. Extracellular and intracellular factors affecting nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes collected from different sizes of follicles. 2002 Zygote. 10(3):253-260.
- Louvet JP, Vaitukaitis JL. Induction of follicle-stimulating hormone (FSH) receptors in rat ovaries by estrogen priming. 1976 Endocrinology. 99:758-766.
- Luscinskas FW, Lawler J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. 1994 FASEB J. 8(12):929-938.

- Mabjeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, Willard MT, Zhong H, Simons JW, Giannakakou P. ZME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. 2003 *Cancer Cell*. 3(4):363-375.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McLain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davies S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. 1997 *Science*. 277:55-60.
- Maliba R, Brkovic A, Neagoe PE, Villeneuve LR, Sirois MG. Angiopoietin-mediated endothelial P-selectin translocation: cell signaling mechanisms. 2008 *J Leukoc Biol*. 83(2):352-360.
- Manabe N, Goto Y, Matsuda-Minehata F, Inoue N, Maeda A, Sakamaki K, Miyano T. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. 2004 *J Reprod Dev*. 50(5):493-514.
- Mao L, Sun C, Zhang H, Li Y, Wu D. 2004 *Anal Chim Acta* 522, 241-246.
- Martinez-Chequer JC, Stouffer RL, Hazzard TM, Patton PE, Molskness TA. Insulin-like growth factor-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor: A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles. 2003 *Biol Reprod*. 68:1112-1118.
- Mason H, Franks S. Local control of ovarian steroidogenesis. 1997 *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 11(2):261-279.
- Mattioli M, Barboni B, Turriani M, Galeati G, Zannoni A, Castellani G, Berardinelli P, Scapolo PA. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. 2001 *Biol. Reprod*. 65:1014-1019.
- Miyano T, Manabe N. Oocyte growth and acquisition of meiotic competence. 2007 *Soc Reprod Fertil Suppl*. 63:531-538.
- Modlich U, Kaup FJ, Augustin HG. Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion. 1996 *Lab Invest*. 74:771-780.
- Montesano R. Cell-extracellular matrix interactions in morphogenesis: an in vitro approach. 1986 *Experientia*. 42(9),977-985.
- Mooberry SL. Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: new developments. 2003 *Drug Resist Updat*. 6(6):355-361.
- Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Højrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. 1999 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(6):2811-2816.

- Mukherjee S, Palczewski K, Gurevich V, Benovic JL, Banga JP, Hunzicker-Dunn M. A direct role for arrestins in desensitization of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor in porcine ovarian follicular membranes. 1999 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(2):493-498.
- Nakhuda GS, Zimmermann RC, Bohlen P, Liao F, Sauer MV, Kitajewski J. Inhibition of the vascular endothelial cell (VE)-specific adhesion molecule VE-cadherin blocks gonadotropin-dependent folliculogenesis and corpus luteum formation and angiogenesis. 2005 *Endocrinology*. 146(3):1053-1059.
- Nandi S, Kumar VG, Manjunatha BM, Gupta PS. Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. 2007 *Dev Growth Differ*. 49(1):61-66.
- Neeman N, Abramovitch R, Schiffenbauer YS, Tempel C. Regulation of angiogenesis by Hypoxic stress: from solid tumours to the ovarian follicle. 1997 *Int J Exp Path*. 78:57-70.
- Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weindel K, Keck C, Weich HA, Marme D, Breckwoldt M. Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. 1995 *J Clin Endocrinol Metab*. 80(6):1967-1971.
- Newman SP, Leese MP, Purohit A, James DR, Rennie CE, Potter BV, Reed MJ. Inhibition of in vitro angiogenesis by 2-methoxy- and 2-ethyl-estrogen sulfamates. 2004 *Int J Cancer*. 109(4):533-540.
- Nör JE, Polverini PJ. Role of endothelial cell survival and death signals in angiogenesis. 1999 *Angiogenesis*. 3(2):101-116.
- Ohnishi J, Ohnishi E, Shibuya H, Takahashi T. Functions for proteinases in the ovulatory process. 2005 *Biochim Biophys Acta*. 1751(1):95-109.
- O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, Folkman J, Moses MA. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. 1999b *J Biol Chem*. 274(41):29568-29571.
- Orsi NM, Gopichandran N, Leese HJ, Picton HM, Harris SE. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. 2005 *Reproduction*. 129(2):219-228.
- Otani H, Yamoto M, Fujinaga H, Nakano R. Presence and localization of endothelin receptor in the rat ovary and its regulation by pituitary gonadotropins. 1996 *Eur J Endocrinol*. 135(4):449-454.
- Otani N, Sawako M, Yamoto M, Shikone T, Otani H, Nishiyama R, Otani T, Nakano R. The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. 1999 *J Clin Endocrinol Metab*. 84:3845-3851.

- Pagè EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of Hypoxia-inducible Factor-1 α by transcriptional and translation mechanism. 2002 J Biol Chem. 277(50):48403-48409.
- Perez-Stable C. 2-Methoxyestradiol and paclitaxel have similar effects on the cell cycle and induction of apoptosis in prostate cancer cells. 2006 Cancer Lett. 231(1):49-64.
- Petraglia F, Luisi M, Genazzani AR. Fisiopatologia della secrezione degli ormoni steroidei sessuali. 1998 Endocrinologia. 1:1-8.
- Petrik JJ, Gentry PA, Feige JJ, LaMarre J. Expression and localization of thrombospondin-1 and -2 and their cell-surface receptor, CD36, during rat follicular development and formation of the corpus luteum. 2002 Biol Reprod. 67:1522-1531.
- Pinnella KD, Cranmer BK, Tessari JD, Cosma GN, Veeramachaneni DN. Gas chromatographic determination of catecholestrogens following isolation by solid-phase extraction. 2001 J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 758(2):145-152.
- Plendl J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. 2000 Anat Histol Embryol. 29:257-266.
- Ramakrishnan S, Subramanian IV, Yokoyama Y, Geller M. Angiogenesis in normal and neoplastic ovaries. 2005 Angiogenesis. 8(2):169-82.
- Redmer DA, Kirsch JD, Reynolds LP. Production of mitogenic factors by cell types of bovine large estrogen-active and estrogen-inactive follicles. 1991 J Anim Sci. 69:237-245.
- Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. Angiogenesis in the corpus luteum. 2000 Endocrine. 12(1):1-9.
- Richards JS. Maturation of ovarian follicle: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. 1980 Physiol. Rev. 60:51-69.
- Ricker JL, Chen Z, Yang XP, Pribluda VS, Swartz GM, Van Waes C. 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor 1 α , tumor growth, and angiogenesis and augments paclitaxel efficacy in head and neck squamous cell carcinoma. 2004 Clin Cancer Res. 10(24):8665-8673.
- Roemisch J, Gray E, Hoffmann JN, Wiedermann CJ. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. 2002 Blood Coagul Fibrinolysis. 13(8):657-670.
- Ruas JL, Lendahl U, Poellinger L. Modulation of vascular gene expression by hypoxia. 2007 Curr Opin Lipidol. 18(5):508-514.
- Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. 2005 J Cell Mol Med. 9(2):267-285.
- Sakumoto R, Berisha B, Kawate N, Schams D, Okuda K. Tumor necrosis factor- α and its receptor in bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. 2000 Biol Reprod. 62:192-199.

- Salih SM, Jamaluddin M, Salama SA, Fadl AA, Nagamani M, Al-Hendy A. Regulation of catechol O-methyltransferase expression in granulosa cells: a potential role for follicular arrest in polycystic ovary syndrome. 2007 *Fertil Steril*.
- Sandau KB, Fandrey J, Brüne B. Accumulation of HIF-1 α under the influence of nitric oxide. 2001 *Blood*. 15;97(4):1009-1015.
- Sano Y, Suzuki K, Arai K, Okinaga S, Tamaoki BI. Changes in enzyme activities related to steroidogenesis in human ovaries during the menstrual cycle. 1981 *J Clin Endocrinol Metab*. 52(5):994-1001.
- Schams D, Berisha B, Kosmann M, Amselgruber WM. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. 2002 *Domest Anim Endocrinol*. 22:51–72.
- Schams D, Berisha B, Kosmann M, Einspanier R, Amselgruber WM. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. 1999 *Domest Anim Endocrinol*. 17 (2-3):279-285.
- Schroedl C, McClintock DS, Budinger GR, Chandel NS. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 α requires mitochondrial reactive oxygen species. 2002 *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 283(5):L922-931.
- Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. 2000 *J Appl Physiol*. 88:1470-1480.
- Senbon S, Hirao Y, Miyano T. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. 2003 *J Reprod Dev*. 49(4):259-269.
- Shang W, Konidari I, Schomberg DW. 2-Methoxyestradiol, an endogenous estradiol metabolite, differentially inhibits granulosa and endothelial cell mitosis: a potential follicular antiangiogenic regulator. 2001 *Biol Reprod*. 65(2):622-627.
- Sharma SC, Catterall JF. Expression of extracellular domain peptides of the FSH receptor and their effect on receptor-ligand interactions in vitro. 1995 *Mol Cell Endocrinol*. 115(1):87-93.
- Sharma SC, Richards JS. Regulation of AP1 (Jun/Fos) factor expression and activation in ovarian granulosa cells. Relation of JunD and Fra2 to terminal differentiation. 2000 *J Biol Chem*. 275:33718–33728.
- Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB, Taylor RN. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. 1996 *J Clin Endocrinol Metab*. 81(8):3112-8.

- Shikone T, Yamoto M, Nakano R. Follicle-stimulating hormone induces functional receptors for basic fibroblast growth factor in rat granulosa cells. 1992 *Endocrinology*. 131(3):1063-1068.
- Shimizu T. Promotion of ovarian follicular development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) and growth differentiation factor 9 (GDF-9) genes. 2006 *J Reprod Dev*. 52(1):23-32.
- Shiverick KT, Notelovitz M. Regulation of cytochrome P-450-dependent catechol estrogen formation in rat liver microsomes. Evidence for involvement of estrogen receptors. 1983 *Biochem Pharmacol*. 32(16):2399-2403.
- Sidky YA, Borden EC. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. 1987 *Cancer Res*. 47(19):5155-5161.
- Silberzahn P, Almahbobi G, Dehennin L, Merouane A. Estrogen metabolites in equine ovarian follicles: gas chromatographic-mass spectrometric determinations in relation to follicular ultrastructure and progesterin content. 1985 *J Steroid Biochem*. 22(4):501-505.
- Slaton JW, Perrotte P, Inoue K, Dinney CP, Fidler I. Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. 1999 *J. Clin Cancer Res*. 5(10):2726-2734.
- Slaton JW, Karashima T, Perrotte P, Inoue K, Kim SJ, Izawa J, Kedar D, McConkey DJ, Millikan R, Sweeney P, Yoshikawa C, Shuin T, Dinney CP. Treatment with low-dose interferon-alpha restores the balance between matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin expression in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res*. 2001 Sep;7(9):2840-53.
- Links
- Smith GW, Moor RM, Smith MF. Identification of a 30,000 M (r) polypeptide secreted by cultured ovine granulosa cells and luteal tissue as a tissue inhibitor of metalloproteinases. 1993 *Biol Reprod*. 48:125-132.
- Spicer LJ, Hammond JM. 2-Hydroxyestradiol modulates a facilitative action of catecholamines on porcine granulosa cells. 1987a *Endocrinology*. 120(6):2375-2382
- Spicer LJ, Hammond JM. Catecholestrogens stimulate progesterin secretion by cultured porcine granulosa cells. 1987b *Mol Cell Endocrinol*. 50(1-2):139-147.
- Spicer LJ, Hammond JM. Regulation of ovarian function by catecholestrogens: current concepts. 1989a *J Steroid Biochem*. 33(4A):489-501.
- Spicer LJ, Hammond JM. Mechanism of action of 2-hydroxyestradiol on steroidogenesis in ovarian granulosa cells: interactions with catecholamines and gonadotropins involve cyclic adenosine monophosphate. 1989b *Biol Reprod*. 40(1):87-95.

- Stetler-Stevenson WG, Seo DW. TIMP-2: an endogenous inhibitor of angiogenesis. 2005 Trends Mol Med. 11(3):97-103.
- Stocco C, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. 2007 Endocr Rev. 28(1):117-149.
- Stouffer RL, Xu F, Duffy DM. Molecular control of ovulation and luteinization in the primate follicle. 2007 Front Biosci. 12:297-307.
- Stromblad S, Becker JC, Yebra M, Brooks PC, Cheresh DA. Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin v3 during angiogenesis. 1996 J. Clin. Invest. 98:426-433.
- Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. 1999 Proc Natl Acad Sci.U.S.A. 96 (4):1246-1251.
- Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresh DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. 2001 J Cell Biol. 155(3):459-470.
- Tajima K, Orisaka M, Mori T, Kotsuji F. Ovarian theca cells in follicular function. 2007 Reprod Biomed Online. 15(5):591-609.
- Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells. 2001 J Biol Chem. 276(43):39562-39568.
- Taylor PD, Hillier SG, Fraser HM :Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. 2004 J Endocrinol. 183:1-17.
- Taylor PD, Wilson H, Hillier SG, Wiegand SJ, Fraser HM. Effects of inhibition of vascular endothelial growth factor at time of selection on follicular angiogenesis, expansion, development and atresia in the marmoset. 2007 Mol Hum Reprod. 13(10):729-736.
- Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, Alitalo K, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Stewart DJ. Biological action of angiopoietin 2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. 2001 Cardiovasc Res. 49:659-670.
- Tesone M, Stouffer RL, Borman SM, Hennebold JD, Molskness TA :Vascular endothelial growth factor (VEGF) production by the monkey corpus luteum during the menstrual cycle: isoform-selective mRNA expression in vivo and hypoxia-regulated protein secretion in vitro. 2005 Biol Reprod. 73:927-934.
- Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. 2006 Reprod Biol Endocrinol. 4:19.

- Thuringer D, Maulon L, Frelin C. Rapid transactivation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/Fik-1 by the bradykinin B2 receptor contributes to endothelial nitric-oxide synthase activation in cardiac capillary endothelial cells. 2002 J Biol Chem. 277(3):2028-2032.
- Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. 1999 Science 286:2511-2514.
- Tsukamoto A, Kaneko Y, Yoshida T, Han K, Ichinose M, Kimura S. 2-Methoxyestradiol, an endogenous metabolite of estrogen, enhances apoptosis and beta-galactosidase expression in vascular endothelial cells. 1998 Biochem Biophys Res Commun. 248(1):9-12.
- Urbich C, Dernbach E, Reissner A, Vasa M, Zeiher AM, Dimmeler S. Shear stress-induced endothelial cell migration involves integrin signaling via the fibronectin receptor subunits alpha(5) and beta(1). 2002 Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22(1):69-75.
- Ushio-Fukai M. Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. 2006 Cardiovasc. Res. 71:226-235.
- Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perfollicular blood flow characteristics. 1997 Hum Reprod. 12(5):1047-1055.
- Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. 2008 Arterioscler Thromb Vasc Biol. 28(2):223-232.
- Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, Amin M, Bouck NP. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. 2002 Nat Med. 8(4):349-357.
- Weisz A, Bresciani F. Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus. 1988 Mol Endocrinol. 2(9):816-24.
- Wandji SA, Gadsby JE, Barber JA, Hammond JM. Messenger ribonucleic acids for MAC25 and connective tissue growth factor (CTGF) are inversely regulated during folliculogenesis and early luteogenesis. 2000 Endocrinology. 141:2648-2657.
- Wary KK, Thakker GD, Humtsoe JO, Yang J. Analysis of VEGF responsive genes involved in the activation of endothelial cells. 2003 Mol. Cancer. 9:2-25.
- Watanabe Y, Lee SW, Detmar M, Ajioka I, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) delays and induces escape from senescence in human dermal microvascular endothelial cells. 1997 Oncog. 14(17):2025-2032.

- Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. 2003 Reprod Suppl. 61:71-90.
- Wentz MJ, Jamaluddin M, Garfield RE, Al-Hendy A. Regulation of catechol-O-methyltransferase expression in human myometrial cells. 2006 Obstet Gynecol. 108(6):1439-1447.
- Wickström SA, Alitalo K, Keski-Oja J. An endostatin-derived peptide interacts with integrins and regulates actin cytoskeleton and migration of endothelial cells. 2004 J Biol Chem. 279(19):20178-20185.
- Wiesener MS, Turley H, Allen WE, William C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, et al. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia inducible factor-1 alpha. 1998 Blood. 92:2260-2268.
- Wise T. Biochemical analysis of bovine follicular fluid: albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroids and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank, atresia classification and day of estrous cycle. 1987 J Anim Sci. 64(4):1153-1169.
- Wu J, Tian Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle in vitro. 2007 Zygote. 15(3):233-240.
- Wulff C, Wilson H, Wiegand SJ, Rudge JS, Fraser HM :Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor trap R1R2. 2002 Endocrinology. 143:2797-2807.
- Wulff C, Fraser HM, Duncan WC, Brucker C, Kreienberg R :Evidence that tight junction proteins (occludin, claudin-1 and 2) are involved in regulation of permeability in the human corpus luteum, Programm for the 37th annual meeting of the Society for the Study of Reproduction. 2004 Biol Reprod.
- Xia C, Meng Q, Liu LZ, Rojanasakul Y, Wang XR, Jiang BH. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. 2007 Cancer Res. 67(22):10823-10830.
- Xu F, Stouffer RL :Local delivery of angiopoietin-2 into the preovulatory follicle terminates the menstrual cycle in rhesus monkeys. 2005 Biol Reprod. 72:1352-1358.
- Yamamoto S, Konishi I, Tsuruta Y, Nanbu K, Mandai M, Kuroda H, Matsushita K, Hamid AA, Yura Y, Mori T. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. 1997 Gynecol Endocrinol. 11:372-381.

- Yang CR, Hsieh SL, Ho FM, Lin WW. Decoy receptor 3 increases monocyte adhesion to endothelial cells via NF-kappa B-dependent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, and IL-8 expression. 2005 J Immunol. 174(3):1647-1656.
- Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, Lin H, Yeh SD, Altuwaijri S, Zhou X, Xing L, Boyce BF, Hung MC, Zhang S, Gan L, Chang C. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. 2002 Proc Natl Acad Sci U S A. 99(21):13498-13503.
- Yue TL, Wang X, Loudon CS, Gupta S, Pillarisetti K, Gu JL, Hart TK, Lysko PG, Feuerstein GZ. 2-Methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, induces apoptosis in endothelial cells and inhibits angiogenesis: possible role for stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas expression. 1997 Mol Pharmacol. 51(6):951-962.
- Yukami T, Hasegawa M, Matsushita Y, Fujita T, Matsushita T, Horikawa M, Komura K, Yanaba K, Hamaguchi Y, Nagaoka T, Ogawa F, Fujimoto M, Steeber DA, Tedder TF, Takehara K, Sato S. Endothelial selectins regulate skin wound healing in cooperation with L-selectin and ICAM-1. 2007 J Leukoc Biol. 82(3):519-531.
- Zacharia LC, Piché CA, Fielding RM, Holland KM, Allison SD, Dubey RK, Jackson EK. 2-hydroxyestradiol is a prodrug of 2-methoxyestradiol. 2004 J Pharmacol Exp Ther. 309(3):1093-1097.
- Zhang W, Chuang YJ, Swanson R, Li J, Seo K, Leung L, Lau LF, Olson ST. Antiangiogenic antithrombin down-regulates the expression of the proangiogenic heparan sulfate proteoglycan, perlecan, in endothelial cells. 2004 Blood. 103(4):1185-1191.
- Zhou M, Sutliff RF, Paul RJ, Lorenz JN, Hoying JB, Haudenschild CC, Yin M, Coffin JD, Kong L, Kranias EG. et al., Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. 1998 Nat Med. 4:201-207.
- Zhu BT, Conney AH. Is 2-methoxyestradiol an endogenous metabolite that inhibits mammary carcinogenesis? 1998 Cancer Research 58:2269-2277.
- Zhu Z, Witte L. Inhibition of tumor growth factor metastasis by targeting tumor associated angiogenesis with antagonist to the receptors of vascular endothelial growth factor. 1999 Invest New Drugs. 17(3):195-212.
- Zimmermann RC, Xiao E, Husami N, Sauer MV, Lobo R, Kitajewski J, Ferin M. Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. 2001 J Clin Endocrinol Metab. 86:768-772.

Zimmermann RC, Xiao E, Bohlen P, Ferin M :Administration of antivasculat endothelial growth factor receptor 2 antibody in the early follicular phase delays follicular selection and development in the rhesus monkey. 2002 Endocrinology. 143:2496-2502.